

Mémoire

Auteur : Dantinne, Sophie

Promoteur(s) : Lebrun, Marielle

Faculté : Faculté des Sciences

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

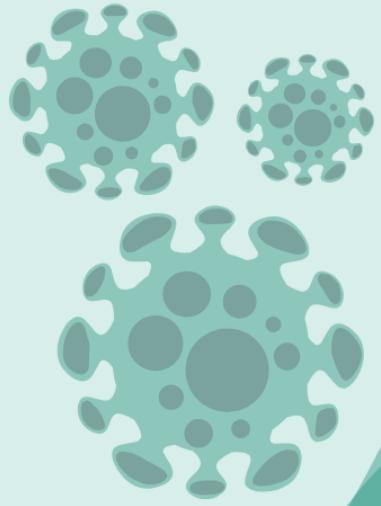
Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/23816>

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.



Étude du mécanisme d'inhibition des granules de stress par le Virus de la Varicelle et du Zona

Mémoire en vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, finalité approfondie

Université de Liège
Faculté des Sciences
Département des Sciences de la Vie

Dantinne Sophie
Laboratoire d'immunologie et de virologie, GIGA
Promotrice : Dr. Lebrun Marielle
Co-promotrice : Pr. Sadzot Catherine
Année académique : 2024-2025, session de septembre

RÉSUMÉ

Lors de la perception de certains facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques par des kinases eIF2 α , la cellule déclenche la réponse intégrée au stress (ISR), aboutissant à l’assemblage de granules de stress (GS). Ces granules d’ARN sont des biocondensats moléculaires qui interviennent dans de nombreux processus cellulaires, dont la réponse antivirale. En conséquence, de nombreux virus ont développé des stratégies pour empêcher leur formation ou augmenter leur désassemblage. Des données préliminaires obtenues au laboratoire ont démontré que le Virus de la Varicelle et du Zona (VZV) est à l’origine d’une inhibition de la formation des GS induite par l’arsénite, la thapsigargine et un choc thermique.

Dans l’optique d’étudier la stratégie d’inhibition des GS exploitée par VZV, l’identification de la(des protéine(s) virale(s) impliquée(s) dans ce mécanisme est cruciale. Ainsi, parmi les 71 ORFs encodés par le virus, des souches de VZV KO pour six d’entre eux (ORF1, ORF3, ORF36, ORF58, ORF59 et ORF65) ont été générées par la méthode de clonage « en passant », puis ciblées. Ce phénotypage a mis en évidence que la délétion de ces protéines n’a pas d’impact sur la proportion de cellules infectées présentant des GS après un traitement à l’arsénite.

Afin de définir la classe de gènes à laquelle appartient celui/ceux qui encode(nt) la(les) protéine(s) de VZV responsable(s) de l’inhibition des GS, une cinétique d’infection a été réalisée. Dans cette expérience, de l’acide phosphonoacétique (PAA) a été ajouté dans la moitié des conditions, afin d’inhiber la réplication de l’ADN génomique viral et donc l’expression de tous les gènes tardifs. La synchronisation de l’infection a nécessité l’utilisation d’un lysat de cellules infectées comme inoculum. En conséquence, de nombreuses cellules infectées présentaient des GS spontanées, probablement dus à une synergie entre le mode d’infection et la présence de macromolécules cellulaires et virales dans l’inoculum. Dans ces conditions, l’ajout d’arsénite réduit la proportion de cellules infectées présentant des GS, suggérant que l’arsénite pourrait également activer une protéine virale favorisant le désassemblage des GS. Enfin, l’effet du PAA n’a pas pu être interprété de façon certaine.

Étude du mécanisme d’inhibition des granules de stress par le Virus de la Varicelle et du Zona

Mémorant : Dantinne Sophie

Promotrice : Dr. Lebrun Marielle

Co-promotrice : Pr. Sadzot Catherine

Laboratoire d’immunologie et de virologie, GIGA

Année académique : 2024-2025

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements au Dr Marielle Lebrun, ma promotrice qui, malgré son emploi du temps chargé, a toujours été disponible pour répondre à mes questions. De plus, sa bonne humeur et sa passion pour la virologie étaient réellement communicatives, rendant l'atmosphère chaleureuse.

Je suis également très reconnaissante envers le Pr Catherine Sadzot, qui a accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire. Ses nombreux conseils issus des *lab meetings* étaient toujours d'une grande aide dans l'avancée du projet. J'ai aussi beaucoup de gratitude pour la confiance qu'elle m'a accordée en me permettant d'encadrer les travaux pratiques de virologie. Ceux-ci ont contribué à mon évolution en tant que scientifique et m'ont fait prendre conscience du plaisir de partager ses connaissances avec des étudiants.

Mes plus profondes gratitude vont à Victoire Mouton et à Manon Koumoth pour leur encadrement de qualité. Outre les nombreuses connaissances théoriques et pratiques qu'elles m'ont transmises, j'aimerais également les remercier pour leur patience et leur investissement dans les multiples relectures de mon mémoire. De plus, leur positivité m'a réconfortée lorsque les problèmes pratiques se sont accumulés.

J'aimerais également remercier chacun des membres du laboratoire de virologie : Cédric pour son humour, Clément pour sa bienveillance, Florine pour sa sympathie et Maxime pour son enthousiasme. Un grand merci aux membres du laboratoire d'immunométabolisme et de GEC, ainsi qu'aux autres mémorants, Noa, Sacha et Wiktoria, qui ont grandement participé à la bonne ambiance tout au long de l'année, ainsi qu'au *team-Building*.

Pour terminer, je tiens tout particulièrement à remercier mon compagnon Sébastien, qui m'a soutenu dans les moments les plus difficiles de mes études, ainsi que ma famille et mes amis, sans qui ces dernières années n'auraient pas été aussi agréables.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4EBP	<i>4E binding protein</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARPE-19	<i>Arising retinal pigment epithelia-19</i>
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>
Cm	Chloramphénicol
CMH-I	Complexe majeur d'histocomptabilité de classe I
CMV	Cytomégalovirus
CPAS	<i>Cleavage and polyadenylation site</i>
DAMP	Motif moléculaire associé au danger
DC	Cellule dendritique
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
E	<i>Early</i>
eIF2	<i>Eukaryotic translation initiation factor</i>
EL	<i>Early late</i>
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
FBS	<i>Fœtal bovine serum</i>
FMRP	<i>Fragile X mental retardation protein</i>
G3BP1	<i>RasGAP-associated endoribonuclease 1</i>
GCN2	<i>General control non deppressible 2</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GS	Granule de stress
GTP	Guanosine triphosphate
HHV-3	<i>Human Herpesvirus 3</i>
HRI	<i>Heme-regulator inhibitor</i>
HSV	<i>Herpès simplex</i>
IDR	Domaine intrinsèquement désordonné
IE	<i>Immediate early</i>
IFN	Interféron
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
IRF3	<i>Interferon regulatory factor3</i>
IRL/IRS	Répétitions internes longues/courtes
ISG	<i>Interferon stimulated genes</i>
ISR	Réponse intégrée au stress

JAK-STAT	<i>Janus tyrosine-kinase – signal transducer and activator of transcription</i>
Kana	Kanamycine
KanR	Gène de resistance à la kanamycine
KO	<i>Knock-out</i>
L	<i>Late</i>
LB	Milieu Luria-Bertani
Lgp2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LL	<i>Leaky late</i>
LLPS	Séparation de phase liquide-liquide
Lt	Lymphocyte T
MAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes commensaux
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
mRNP	Ribonucléoprotéine messager
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
NLRP	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAA	Acide phosphonoacétique
PAF	Paraformaldéhyde
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PB	<i>P-bodies</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyéthylèneimine
PERK	<i>Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PGSC	PBS-sucrose-glutamate-sérum
PIC	Complexe de pré-initiation
PKR	<i>Protein kinase R</i>
PLD	<i>Prion-like domain</i>
PP1	Protéine phosphatase 1
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PRV	<i>Pseudorabies virus</i>
PTM	Modification post-traductionnelle
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RACK1	<i>Receptor for activated C kinase 1</i>
RBP	<i>RNA binding protein</i>

RE	Réticulum endoplasmique
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RLR	Récepteur de type RIG-I like
RT	<i>Room temperature</i>
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
TA	<i>Tail-anchored</i>
TE	<i>True early</i>
TIA1	<i>T cell internal antigen 1</i>
TIAR	<i>TIA-1 related protein</i>
TIR	Récepteur toll/interleukine-1
TK	Thymidylate kinase
TL	<i>True late</i>
TLR	Récepteur de type toll-like
TMP	Thymidine monophosphate
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF2	<i>TNF receptor associated factor 2</i>
TRL/TRS	Répétitions terminales longues/courtes
TSS	<i>Transcription start site</i>
TPP	Thymidine triphosphate
UL/US	Région unique longue/courte
UV	Ultraviolet
Vhs	<i>Viral host shutoff protein</i>
VLT	<i>Varicella-zoster virus latency-associated transcript</i>
VZV	Virus de la Varicelle et du Zona
WT	<i>Wild-type</i>

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1) Introduction générale	1
a) Généralités sur les virus	1
2) Le virus de la varicelle et du zona (VZV)	2
a) Carte d'identité de VZV	2
b) Caractéristiques structurales et génomiques de VZV.....	3
c) La primo-infection	6
d) Le cycle infectieux de VZV	7
e) Symptômes et complications de la varicelle	9
f) La latence de VZV	10
g) La réactivation de VZV.....	12
h) Symptômes et complications du zona.....	12
i) Épidémiologie et vaccination	13
3) Mise en place d'une réponse immunitaire lors d'une infection par VZV	14
a) Les récepteurs de l'immunité innée	14
b) Contournement de VZV.....	15
4) Les granules de stress	16
a) Introduction sur les granules d'ARN.....	16
b) La réponse intégrée au stress (ISR)	17
c) Assemblage des granules de stress	19
d) Composition et dynamisme des GS.....	20
e) Désassemblage des GS	20
f) Fonctions des GS	22
g) Résistance des virus face aux GS	22
Objectifs	24
Matériels et méthodes.....	25
1) Culture cellulaire	25
a) Les lignées cellulaires	25
2) Génération des virus délétants : le clonage « en passant ».....	25
a) Electrocompétence des GS1783.....	26
b) Génération de la cassette PCR	26

c)	Électroporation et première recombinaison Red.....	27
d)	PCR sur colonie des clones parents	27
e)	Deuxième recombinaison Red.....	28
f)	PCR sur colonie des clones enfants	29
3)	Génération des virus délétants : maxi-préparation de BAC sur un gradient de chlorure de césium	29
a)	Amplification et extraction du BAC	29
b)	Élimination des ARN résiduels.....	30
c)	Purification de l'ADN sur un gradient de chlorure de césium	30
4)	Transfection.....	31
5)	Extraction d'ADN génomique.....	31
6)	Western-blot	32
a)	Extraction des protéines.....	32
b)	Préparation du gel d'électrophorèse, migration des extraits protéiques et transfert	33
c)	Marquage des protéines d'intérêt et révélation	33
7)	Cinétique d'inhibition des GS par VZV	34
a)	Production des particules libres de VZV.....	34
b)	Infection et traitement des cellules.....	34
c)	Croissance virale.....	35
8)	Immunofluorescence	35
a)	ensemencement des ARPE-19 et induction du stress	35
b)	Fixation, perméabilisation et saturation	35
c)	Immunomarquage.....	36
d)	Montage des lames et acquisition des images.....	36
Résultats	37	
1)	Inhibition des granules de stress par le virus de la varicelle et du zona.....	37
2)	Génération de virus délétants.....	39
a)	Introduction d'une mutation ponctuelle via la technique de clonage « en passant »	39
b)	Vérification de la mutation introduite dans le BAC de VZV.....	43
3)	Phénotypage des virus délétants	44
4)	La cinétique d'inhibition des GS par VZV	47
a)	Croissance virale.....	47
b)	Immunofluorescence.....	49

<i>Discussion</i>	54
1) Inhibition des granules de stress par le virus de la varicelle et du zona.....	54
2) Génération de virus délétants.....	56
3) Phénotypage des virus délétants	57
4) Cinétique d'inhibition des GS par VZV	59
<i>Annexes</i>	65
1) Figures supplémentaires	65
2) Tableaux supplémentaires	73
<i>Bibliographie</i>	77

INTRODUCTION

1) Introduction générale

a) Généralités sur les virus

Les virus sont des entités biologiques abondantes sur la Terre puisque le nombre de particules virales est estimé à 10^{31} [1]. Ces derniers infectent tous les organismes vivants mais ne sont pas toujours pathogènes, ils peuvent également vivre en symbiose avec leur hôte [2]. Même si la diversité virale est conséquente, certaines caractéristiques communes sont partagées entre tous les virus. Tout d'abord, la taille de ces entités est généralement comprise entre 20 et 300 nm, bien que des exceptions existent, comme le Pandoravirus dont le diamètre peut atteindre 1 μm [3]. Ensuite, la taille du génome évolue également et est souvent comprise entre 7.000 et 20.000 paires de base (pb), avec comme exception les virus à ADN double brin dont le génome est généralement plus large [4, p. 2]. En conséquence, les virus n'encodent pas l'entièreté du matériel génétique nécessaire pour assurer leur réPLICATION et détournent la machinerie cellulaire pour générer des nouvelles particules virales, appelées des virions. Par exemple, les virus de la famille des *Adenoviridae* encodent notamment une polymérase virale alors que les *Papillomaviridae*, dont le génome est plus petit, détournent la polymérase de l'hôte [5]. De fait, les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires [4, p. 2].

Contrairement au génome humain, le génome viral est constitué d'ADN (acide désoxyribonucléique) ou d'ARN (acide ribonucléique), simple ou double brin [5]. Toutefois, le génome, qu'il soit d'origine humaine ou virale, est susceptible de subir des dommages à la suite d'agressions extérieures telle qu'une exposition à des rayonnements UV ou radioactifs. Afin d'assurer une protection du génome viral, ce dernier est entouré par une coque protéique, appelée la capsidE. L'ensemble formé par le génome et la capsidE est dénommé la nucléocapsidE [4]. Cette capsidE est formée par la répétition d'un ou de plusieurs types de protéines, et peut arborer une structure icosaédrique ou hélicoïdale. En plus d'une stabilité nécessaire à la protection du génome viral, la capsidE présente un caractère instable qui permet la libération des acides nucléiques dans la cellule hôte [6]. Chez certains virus, la

nucléocapside peut être entourée par une membrane lipidique, formant ainsi une enveloppe. Les virus étant incapables de synthétiser des lipides, cette membrane est dérivée d'une des membranes cellulaires. Chez les virus enveloppés, des protéines tégumentaires permettent de relier l'enveloppe à la capsid. Enfin, des protéines d'attachement virales sont essentielles pour garantir l'entrée du virus dans la cellule hôte. Ces dernières se situent plus précisément au niveau de la capsid pour les virus nus, ou bien au sein de l'enveloppe [4].

2) Le Virus de la Varicelle et du Zona (VZV)

a) Carte d'identité de VZV

Le Virus de la Varicelle et du Zona (VZV), également dénommé *Varicellovirus Human Herpesvirus 3* (HHV-3), fait partie de l'ordre des *Herpesvirales* et de la famille des *Herpesviridae* (<https://ictv.global/taxonomy>). Celle-ci regroupe plus de 130 virus qui infectent une large gamme d'hôtes, allant des mammifères aux mollusques, et se divise en 3 sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae* [7, p. 4]. Parmi ces catégories, seules 9 espèces infectent les êtres humains, dont VZV qui est un alphaherpès-virus appartenant donc à la même famille que les virus Herpès Simplex de type 1 (HSV-1) et de type 2 (HSV-2), responsables de lésions au niveau de la peau et des muqueuses [8]. VZV a un spectre d'hôte restreint puisqu'il n'infecte que les humains. Toutefois, au sein du genre *Varicellovirus* sont notamment retrouvés des virus infectant de nombreux autres mammifères, tels que des virus bovins, équins et simiens [9]. Enfin, selon la classification de Baltimore, VZV appartient à la première classe puisque son génome est formé d'ADN double brin transcrit directement en ARNm [10].

Une caractéristique commune à tous les *Herpesvirus* est leur capacité à établir une infection latente, et donc à persister au sein d'un organisme. Dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, les virus se réfugient au sein de ganglions sensoriels. En revanche, au sein des *Betaherpesvirinae*, qui comprennent notamment le cytomégalovirus, et des *Gammaherpesvirinae*, où on retrouve le virus responsable du sarcome de Kaposi, la latence est plutôt induite au sein des cellules T helper et des tissus lymphoïdes, respectivement [11]. Dans le contexte d'une infection par VZV, la réactivation du virus génère une pathologie

différente que lors de la primo-infection. En effet, lors d'une infection exogène, c'est la varicelle qui est initiée, alors que la réactivation de VZV engendre plutôt le zona [12]. Par conséquent, lorsqu'un virus de classe I pénètre dans une cellule hôte, deux voies sont enclenchées successivement. La première est la voie lytique où la machinerie transcriptionnelle permet l'expression de toutes les protéines virales. La seconde est la voie latente où l'expression complète du protéome n'est pas assurée [13].

b) Caractéristiques structurales et génomiques de VZV

Les particules de VZV possèdent un diamètre compris entre 150 et 200 nm. L'information génétique du virus est encodée par de l'ADN double brin linéaire d'environ 125.000 pb. Ce grand génome est protégé par une capsidé, constituée de 162 capsomères, dont la symétrie est pseudo-icosaédrique du fait de la présence du complexe portal à un des sommets [14][15]. VZV possède une enveloppe lipidique où sont ancrées de nombreuses glycoprotéines virales indispensables pour l'attachement et l'entrée du virus dans les cellules hôtes. Enfin, entre l'enveloppe et la nucléocapside se situe une couche tégumentaire qui comprend de nombreuses protéines régulatrices virales [14][16] (**figure 1a**).

Plus précisément, le génome de VZV est constitué de deux régions uniques : une région unique longue (U_L) d'environ 105.000 pb et une région unique courte (U_S) d'environ 5.000 pb. Chacune de ces régions unique est bordée par des répétitions terminales (TR_L pour la région longue et TR_S pour la région courte), ainsi que par des répétitions internes (IR_L pour la région longue et IR_S pour la région courte)(**figure 1b**) [9].

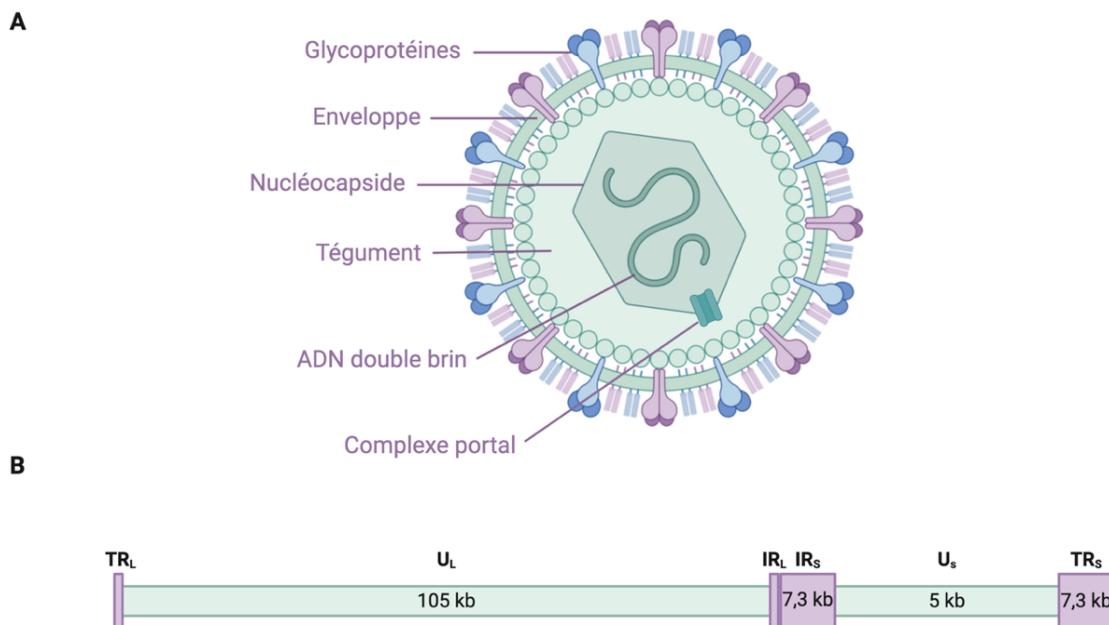


Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'un virion et de l'organisation du génome de VZV. (A) Virion de VZV (150 – 200 nm de diamètre) dont le génome est protégé par une capsid icosaédrique entourée par un tégument et une enveloppe. **(B)** Génome d'ADN double brin (~125 kb) subdivisé en une région unique longue (U_L) et une région unique courte (U_S), chacune encadrée par des répétitions internes (IR_L et IR_S) et terminales (TR_L et TR_S). Images adaptées de H. Liu et al. (2025) [17] et de R. Cohrs et al. (2003) [18].

Au sein du génome, c'est un minimum de 71 cadres de lecture ouverts (*Open Reading Frame*, ORF) qui ont été identifiés sur base des séquences codantes probables, dont 3 sont présents en double copie à cause de leur localisation sur les régions répétées courtes (ORF62, ORF63 et ORF64). Ces ORFs ont initialement été classés en 3 catégories en fonction de leur cinétique d'expression au cours du cycle lytique : les gènes exprimés immédiatement (*Immediate Early*, IE), les gènes exprimés précocement (*Early*, E) et les gènes exprimés tardivement (*Late*, L) [9][19]. Néanmoins, les gènes E semblent pouvoir être divisés en *True-Early* (TE) et en *Early-Late* (EL), tandis que les gènes L peuvent être classés en *Leaky-Late* (LL) et en *True-Late* (TL), à nouveau selon leur cinétique d'expression [19]. L'ADN de VZV est également caractérisé par la présence de 5 éléments répétés, numérotés de 1 à 5 et respectivement localisés sur l'ORF11, l'ORF14, l'ORF22, entre l'ORF62 et l'origine de réPLICATION virale, et entre l'ORF60 et l'ORF61 [20]. De plus, au sein des 71 ORFs, 44 ont été définis comme essentiels pour la réPLICATION virale et 26 ont été spécifiés comme dispensables. La majorité des ORFs essentiels codent pour des protéines qui régulent la transcription, la réPLICATION du génome ou pour des protéines structurales (capsides et glycoprotéines).

d'enveloppe). Enfin, même si certains ORFs sont considérés comme non-essentiels, leur absence peut causer un grave défaut de croissance [21] (**figure 2**).

De manière à assurer son interaction avec une cellule hôte et sa réPLICATION, VZV encode différentes protéines. Tout d'abord, 9 glycoprotéines virales sont produites à partir du génome du virus. Parmi celles-ci, gC et gE sont impliquées dans l'attachement membranaire alors que gB, gH et gL assurent la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique [22]. Ensuite, une protéine du tégument encodée par l'ORF10 est responsable de l'activation de la transcription d'IE62, qui est la principale protéine transactivatrice de VZV [23]. De plus, une ADN polymérase virale est encodée par le virus via deux ORFs (ORF28 et ORF16) qui permettent la synthèse des 2 sous-unités de la protéine. D'autres enzymes sont également encodées par VZV, dont une protéase (ORF33), une DNase (ORF48) ou encore une thymidylate synthase (ORF13) [9].

Parmi les gènes de VZV, nombreux sont homologues à ceux d'HSV et 41 sont conservés au sein des 3 sous-familles des Herpèsvirus [9]. Plus récemment, de nombreux transcrits alternatifs ont été identifiés chez VZV puisque, pour un seul ARN, plusieurs sites de démarrage de la transcription (*Transcription Start Site*, TSS) et de sites de clivage et de polyadénylation (*Cleavage and PolyAdenylation Site*, CPAS) ont été identifiés. En conséquence, même s'il n'y a qu'une septantaine d'ORFs, 136 ARNs polyadénylés ont été discernés, ce qui permet d'augmenter la diversité du protéome viral, en supplément d'un épissage alternatif [19].

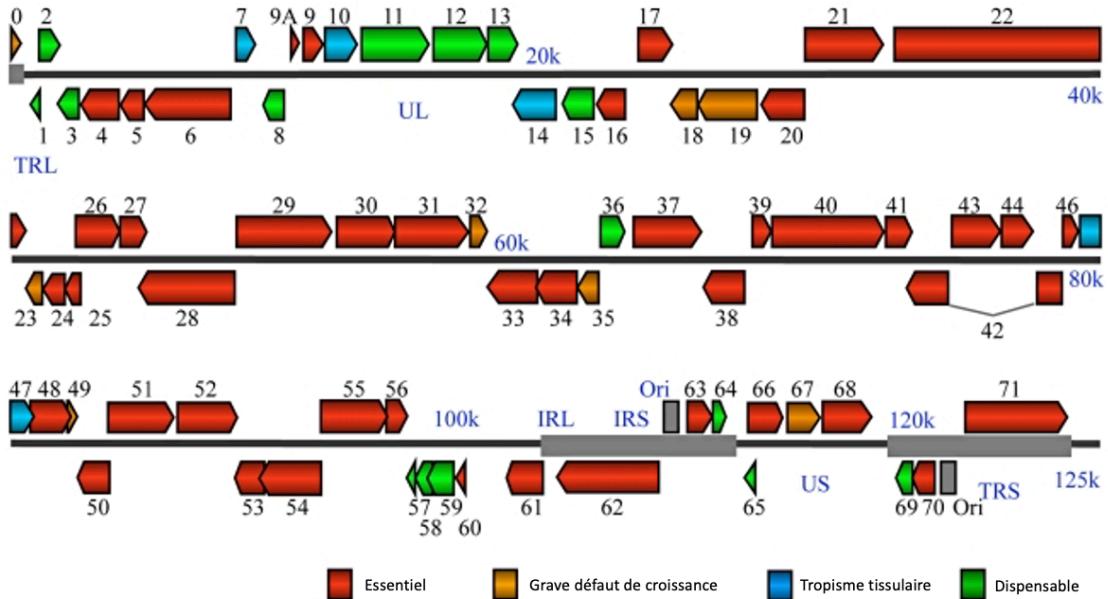


Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation des ORFs sur le génome de VZV. Les flèches représentent les ORFs afin d'identifier leur localisation, leur taille et leur orientation sur le génome de VZV. La couleur des flèches indique si les ORFs sont essentiels (en rouge) ou dispensables (en vert) à la réPLICATION virale, mais également si ce sont des gènes à tropisme tissulaire (en bleu) ou si leur déletion entraîne un grave défaut de croissance (en orange). Image de Z. Zhang et al. (2010) traduite en français [21].

c) La primo-infection

Un individu contagieux peut libérer des aérosols de virions à partir de ses vésicules cutanées, ou transmettre le virus lors d'un contact direct avec les lésions. Lorsque VZV infecte un nouvel hôte, c'est au niveau de l'épithélium du tractus respiratoire supérieur que le virus établit, dans un premier temps, sa réPLICATION [16]. Il se réplique principalement dans l'épiderme de cette muqueuse, où, selon une hypothèse, le virus serait capable d'infecter les cellules dendritiques (DC)[24]. Ces cellules immunitaires migrent vers des organes lymphoïdes, principalement au niveau des amygdales, où le virus est transféré aux lymphocytes T (Lt) [10]. Les lymphocytes infectés se retrouvent dans la circulation sanguine, ce qui a pour conséquence de propager l'infection dans tout l'organisme [16][24] (**figure 3**).

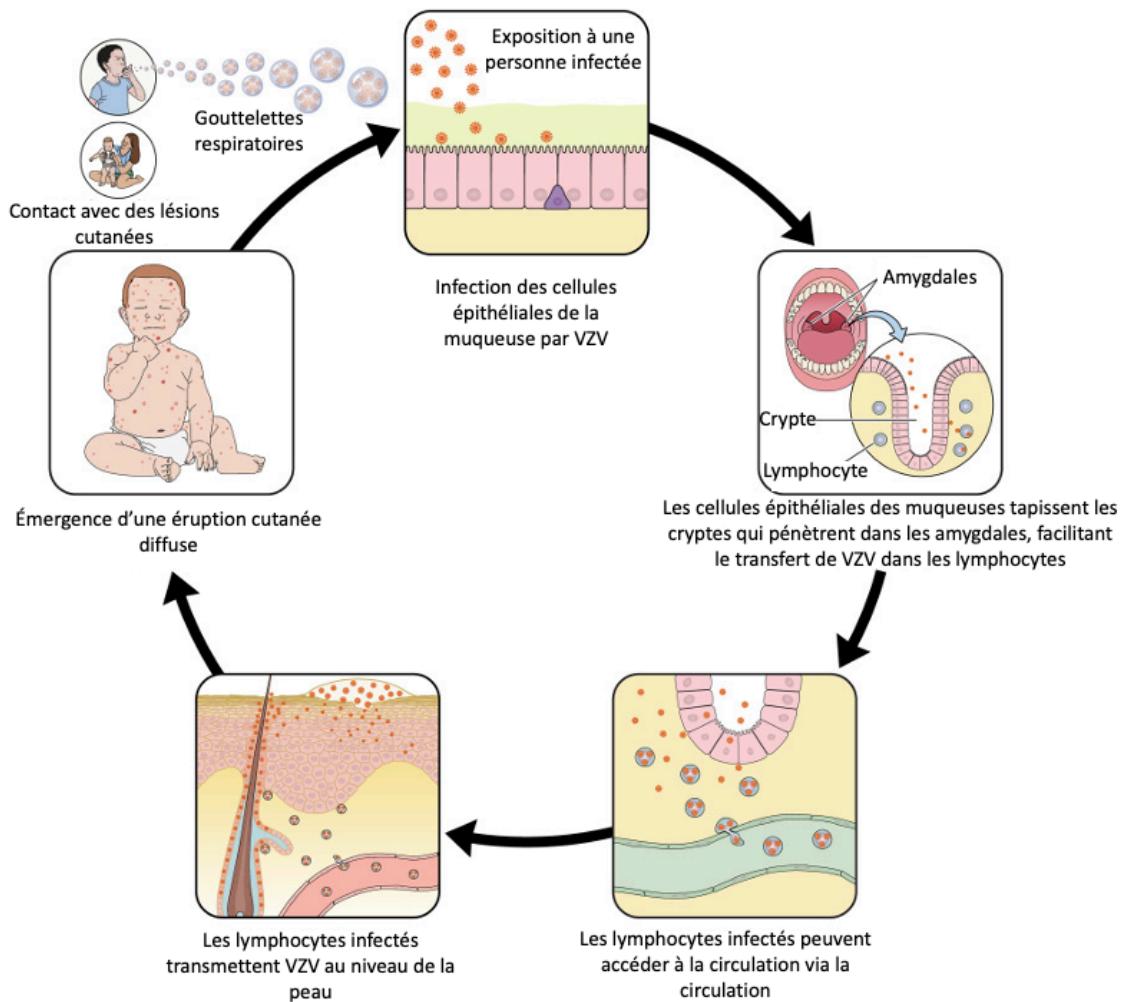


Figure 3 : Représentation schématique de la pathogenèse de VZV lors d'une infection primaire. Le développement de la varicelle chez un individu est une conséquence de l'exposition à une personne infectée par VZV. Lors du contact avec des lésions cutanées ou des gouttelettes respiratoires, le virus atteint les lymphocytes par l'intermédiaire des cellules épithéliales qui tapissent les cryptes au niveau des amygdales. Ces lymphocytes infectés assurent la propagation de l'infection vers les kératinocytes grâce à la circulation. 10 à 21 jours après l'exposition au virus, des lésions cutanées caractéristiques de la varicelle apparaissent et peuvent infecter d'autres individus. Image de A. Arvin (2023) traduite en français [25].

d) Le cycle infectieux de VZV

Concernant le cycle lytique de VZV, les particules virales doivent pénétrer dans la cellule hôte. Néanmoins, ce mécanisme n'est encore que peu défini, mais impliquerait soit une fusion entre l'enveloppe du virus et la membrane plasmique, soit une endocytose [23]. Parmi les 9 glycoprotéines encodées par le génome de VZV, trois candidats (gB, gH et gL) seraient principalement impliqués dans l'interaction avec des récepteurs cellulaires, tels que le

récepteur du mannose-6-phosphate ou la glycoprotéine associée à la myéline [16][26]. Ensuite, une acidification du pH dans les endosomes entraîne un changement de conformation des glycoprotéines virales, qui sont impliquées dans la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome. En conséquence, le tégument se désagrège partiellement, libérant certaines protéines qui permettent à la capsid de s'associer aux microtubules et d'être transportée jusqu'au noyau. Un changement de conformation de la capsid assure la libération de l'ADN viral dans le noyau par l'intermédiaire de pores nucléaires [23]. Une fois que le génome viral est libéré dans le noyau, il se circularise et trois vagues de transcription sont initiées successivement : d'abord les gènes IE, puis les gènes E et enfin les gènes L. La protéine virale majeure agissant comme un transactivateur est IE62, qui coordonne ainsi la cascade transcriptionnelle. Jusqu'à très récemment, IE62 était considérée comme l'une des premières protéines virales exprimées indépendamment de la réPLICATION du virus [16]. Néanmoins, une étude a démontré que l'expression d'IE62 était dépendante de la réPLICATION de l'ADN viral et donc assignée à une nouvelle catégorie de gènes dénommée TL. En conséquence, cela implique que ce sont les protéines IE62 amenées par les particules virales entrant dans la cellule qui initient la transcription des gènes IE, tels que ORF4 et ORF61 [19]. Lorsque l'ADN du virus a été répliqué via le mécanisme de *rolling circle*, le génome complet est alors inséré dans la capsid nouvellement formée de protéines structurales [23]. Afin de se retrouver dans le cytoplasme, la nucléocapsid subit un enveloppement primaire suivi d'un désenveloppement par bourgeonnement à travers la membrane nucléaire interne puis externe. Ensuite, un second enveloppement a lieu au sein de l'appareil de Golgi de manière à acquérir les protéines du tégument et la membrane lipidique servant d'enveloppe virale. Enfin, des vésicules de transport du compartiment post-Golgi permettent de libérer les nouvelles particules virales en dehors de la cellule par exocytose. En conséquence, les virions peuvent infecter d'autres cellules de l'hôte pour que l'infection se propage [23][26] (**figure 4**).

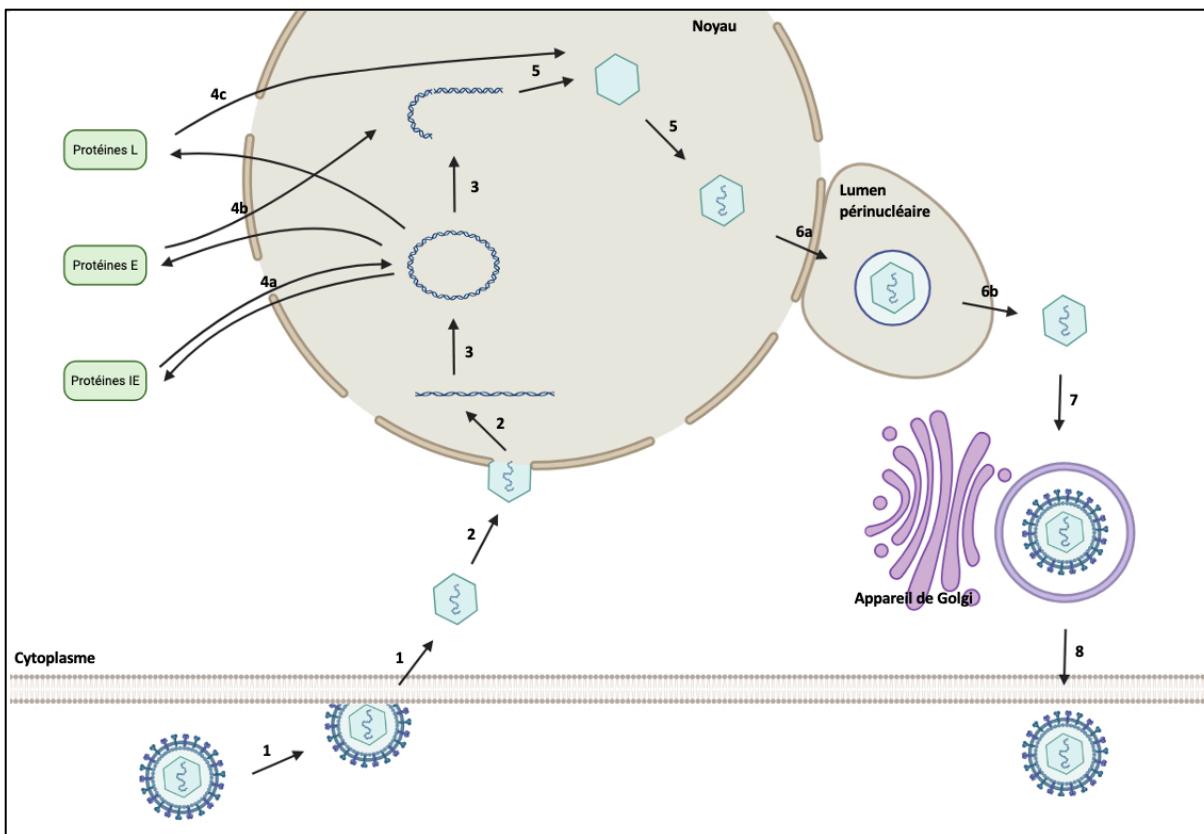


Figure 4 : Représentation schématique du cycle lytique de VZV. Le cycle infectieux se caractérise par 8 étapes. Tout d'abord, (1) le virus entre dans la cellule hôte et (2) est transporté jusqu'au noyau afin d'y libérer l'ADN viral. Ensuite, (3) le génome se circularise et 3 vagues de transcription sont initiées : d'abord (4a) les protéines IE qui sont indispensables pour initier la réplication du génome viral, puis (4b) les protéines E qui sont principalement des kinases et qui contiennent notamment l'ADN polymérase virale et, enfin (4c) les protéines L qui sont des protéines structurales. Lorsque le génome viral a été répliqué, (5) il est alors encapsidé et (6a) acquiert une enveloppe transitoire avant de (6b) la perdre. (7) Le génome subit un second enveloppement au sein de l'appareil de Golgi afin d'incorporer les protéines du tégument et l'enveloppe lipidique. Enfin, (8) les virions sont libérés en dehors de la cellule par exocytose et ils peuvent infecter de nouvelles cellules. Image réalisée avec <https://www.biorender.com/> et inspirée de L. Zerboni et al. (2014) [16] et de S. Sucharita et al. (2023) [27].

e) Symptômes et complications de la varicelle

À la suite d'une contamination et de la période d'incubation du virus de 10 à 21 jours, les symptômes apparaissent chez l'individu malade. Tout d'abord un sentiment de mal-être général, caractérisé par une perte d'appétit, des maux de tête et de la fièvre se manifeste dès les premiers jours [14]. Au cours de cette période, le virus n'est pas capable de se propager immédiatement dans toutes les cellules cutanées. En effet, les lymphocytes T infectés libèrent le virus au niveau de l'épiderme, où les kératinocytes sont abondamment présents et

deviennent le principal site de réPLICATION. Néanmoins, une défense immunitaire est initiée dans cette région via la libération d'interféron- α et VZV doit alors contourner cette barrière immunitaire [10][25]. Ensuite, des lésions vésiculaires se développent sur la peau du malade, d'abord au niveau du tronc, puis elles sont susceptibles de se répandre au niveau du cou et des membres. Au cours du temps, les lésions changent de couleurs et d'aspect puisque les vésicules associées à un prurit évoluent en pustules. Plus tard, celles-ci finissent par se rompre et forment des croûtes qui deviendront éventuellement des cicatrices chez certains patients [12]. La contagiosité de la varicelle débute quelques jours avant l'éruption vésiculaire et s'achève lors de l'apparition des croûtes [14][28].

Dans la majorité des cas, la varicelle se développe chez les enfants et ne génère pas de complications. Cependant, chez des sujets âgés et/ou immunodéprimés, une surinfection bactérienne ainsi que des problèmes neurologiques peuvent se développer, bien que cela ne touche qu'une minorité d'individus [12][24]. Par ailleurs, la contraction de la varicelle au cours des premiers mois de grossesse représente un risque non négligeable pour le foetus. Effectivement, le virus peut infecter l'enfant à naître via le placenta et causer le syndrome de la varicelle congénitale ou un avortement spontané. Cette pathologie entraîne des malformations congénitales, telles qu'une hypoplasie des membres ou des altérations neurologiques [12][14].

f) La latence de VZV

Au cours de la primo-infection, les particules virales infectieuses atteignent les somas des neurones sensoriels situés au sein des ganglions nerveux afin d'y rester sous une forme latente pendant toute la vie [16]. Plus précisément, les ganglions de la racine dorsale et les ganglions du nerf trijumeau sont des sites avérés où VZV peut entrer en latence et se réactiver [14]. Néanmoins, le virus a également été détecté dans des ganglions sensoriels (géniculés, vestibulaires, spiralés) et autonomes (système sympathique et entérique), bien que la capacité du virus à se réactiver à partir de ces régions n'a pas encore été démontrée [29]. Il existerait 2 voies par lesquelles le virus peut accéder au corps cellulaire des neurones (**figure 5**). Tout d'abord, en infectant les cellules cutanées, le virus pourrait avoir accès aux terminaisons nerveuses situées dans le derme et effectuer un transport axonal rétrograde afin

d'atteindre le soma. D'autre part, les lymphocytes T infectés circulants pourraient, au niveau des capillaires des ganglions nerveux, directement transmettre le virus aux cellules satellites. Ces dernières le transmettraient ensuite aux corps cellulaires neuronaux [24][29].

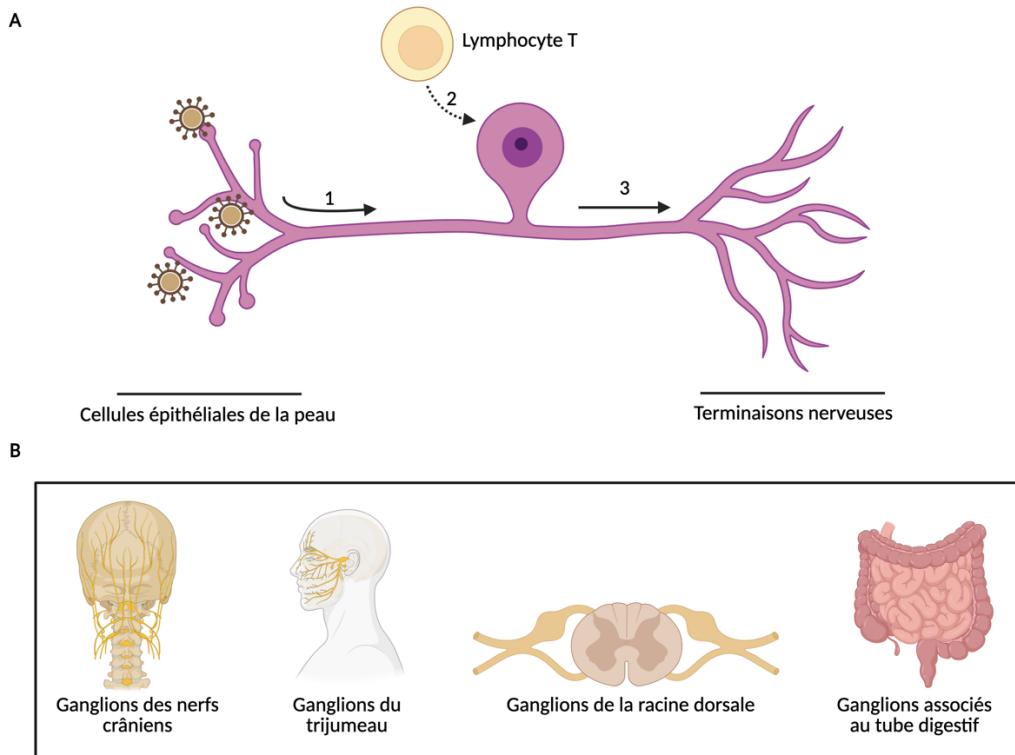


Figure 5 : Représentation schématique de la mise en place et de la localisation de la latence de VZV. (A) Le virus peut atteindre le soma des neurones sensoriels soit (1) en réalisant un transport axonal rétrograde depuis les cellules épithéliales, soit (2) via les lymphocytes T infectés. Cela permet au virus (3) d'établir un état latent dans les terminaisons nerveuses. (B) Sites avérés où VZV établit sa latence. Images réalisées avec <https://www.biorender.com/> et inspirées de D. Depledge et al. (2018) [29].

La mise en latence correspond à une transcription du génome viral qui est relativement limitée [13]. En effet, l'activité transcriptionnelle de VZV se restreint principalement aux régions VLT (*Varicella-zoster virus Latency-associated Transcript*) et ORF63 [30]. VLT est un ARN non-codant épissé et transcrit en antisens de l'ORF61, ce qui lui confère un effet inhibiteur sur l'expression de cette dernière [31]. Le génome viral étant présent sous une forme d'épisome circulaire, l'activité transcriptionnelle est dirigée par différents états chromatiniens. En effet, l'expression du VLT et de l'ORF63 s'explique par la présence d'une marque d'activation transcriptionnelle, telle que H3K9ac, sur leur promoteur. En revanche, la majorité de l'épisome viral est caractérisé par l'assemblage d'une chromatine répressive [29][13]. Malgré l'expression de certaines régions virales, aucune particule de VZV n'est produite au cours de ce cycle latent.

g) La réactivation de VZV

Dans certaines conditions, le virus latent dans les corps cellulaires des neurones peut se réactiver de façon symptomatique et/ou asymptomatique [32]. En effet, l'immunité cellulaire dirigée contre VZV diminue avec l'âge ou si le patient est immunodéprimé. En conséquence, les neurones subissent un stress, activant la kinase N-terminale C-Jun qui phosphoryle des résidus de l'histone H3. Ce changement des PTM (modifications post-traductionnelles) des histones associés à l'ADN viral entrave la liaison des protéines répressives du groupe polycomb, ce qui restaure la transcription des gènes viraux [13]. Une fois réactivé, le virus se déplace des corps cellulaires des neurones vers le dermatome qu'ils innervent via un transport axonal antérograde et conduit au développement du zona [16]. Cette pathologie se caractérise par la présence d'éruptions vésiculaires localisées sur le dermatome innervé par le ganglion à partir duquel VZV s'est réactivé. Par conséquent, contrairement à la varicelle qui est étendue sur une majorité du corps, le zona est plutôt localisé [32]. Néanmoins, il semblerait que des réactivations asymptomatiques du virus soient possibles et récurrentes, mais le système immunitaire serait capable de contrôler la majorité de ces événements de réactivation [29]. Quant à la réactivation symptomatique, et donc au développement du zona, celle-ci ne se déroule qu'une à deux fois au cours de la vie d'un individu et touche principalement une population plus âgée [28].

h) Symptômes et complications du zona

Lors du développement de la pathologie, des douleurs localisées au niveau du dermatome affecté apparaissent dans un premier temps et un sentiment de mal-être est présent, caractérisant la phase pré-éruptive. Quelques jours plus tard, la phase exsudative aigüe se développe pendant quelques semaines et est marquée par l'apparition de vésicules cutanées douloureuses qui, comme la varicelle, sont contagieuses [14]. Le zona demeure généralement sans gravité mais diverses complications peuvent se manifester chez un nombre limité de patients, comme des méningo-encéphalites, un zona ophthalmique pouvant mener à la cécité, des kératites, des ulcères gastro-intestinaux, des hépatites, ... [12][14]. La complication la plus fréquente, qui se développe chez 15% des individus, est la névralgie post-herpétique. Cette pathologie est caractérisée par une douleur intense qui persiste plusieurs mois après l'apparition du zona [28].

i) Épidémiologie et vaccination

Le virus de la varicelle et du zona présente une distribution mondiale puisqu'il est hautement contagieux. Concernant l'incidence de la varicelle, celle-ci est dépendante du climat de la zone géographique. En effet, l'infection semble pouvoir se propager plus difficilement dans des pays où l'environnement général est chaud et où le taux d'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV) est important [33]. Par conséquent, la maladie est majoritairement contractée avant l'adolescence dans les climats tempérés, alors que dans les climats tropicaux, l'âge moyen des personnes infectées est plus élevé [34][14]. Quant au zona, il est également répandu à l'échelle mondiale mais, contrairement à la varicelle, ne semble pas présenter de variations en fonction de la période saisonnière [12]. La fréquence d'apparition de la maladie augmente avec l'âge, avec un risque de développer le zona qui est supérieur à 50% après 85 ans [35].

En 1971, un scientifique japonais dénommé Michiaki Takahashi, a isolé la forme sauvage de VZV à partir des éruptions vésiculaires d'un enfant atteint de la varicelle, appelée pOka, et a conçu une souche vivante atténuée de ce virus, étiquetée vOka [12]. Deux vaccins permettant de lutter contre la varicelle sont actuellement disponibles sur le marché et sont tous deux des vaccins atténués du VZV, et plus précisément de la souche pOka [35]. Ces derniers, appelés Varivax® de la firme Merck et Varilrix® de la firme GSK, sont injectés chez les jeunes enfants et chez les adultes ne présentant pas d'immunité contre VZV, mais ils sont contre-indiqués chez les patients immunodéprimés [36]. Dans les pays où la vaccination contre VZV a été installée, entre autres aux États-Unis, le taux d'hospitalisations à la suite de complications a nettement baissé après l'injection de deux doses. Les individus vaccinés peuvent néanmoins développer la varicelle dans de rares cas mais la maladie est sans gravité et moins contagieuse pour les personnes sensibles [28].

Les vaccins contre le zona ont, à nouveau, été développés par Merck et GSK et sont dénommés Zostavax® et Shingrix®, respectivement. Tout comme le vaccin contre la varicelle, le Zostavax® est un vaccin vivant atténué à partir de la souche pOka, alors que Shingrix® est un vaccin contenant une forme recombinante de la glycoprotéine E. Ces vaccins sont plutôt réservés aux personnes de plus de 50 ans et l'avantage de Shingrix® est qu'il peut être

administré chez des patients présentant une immunodéficience [36]. Puisque les individus plus âgés présentent un risque accru de développer des complications suite à la réactivation de VZV, la vaccination permet de les diminuer significativement [14].

Lors d'une infection par VZV, des traitements antiviraux peuvent également être administrés chez les patients de manière à réduire la sévérité de la pathologie. Il s'agit d'analogues de nucléosides et de prodrogues, tels que l'acyclovir, le famciclovir ou encore la brivudine, qui interfèrent avec la réPLICATION virale [35].

3) Mise en place d'une réponse immunitaire lors d'une infection par VZV

a) Les récepteurs de l'immunité innée

Lorsque VZV pénètre dans l'organisme, une réponse innée du système immunitaire se met rapidement en place. Cette première ligne de défense de l'organisme, contrairement à l'immunité adaptative, n'est pas spécifique mais nécessite tout de même la perception de la nature du pathogène [37]. À cette fin, des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptor*, PRR) sont présents de manière à reconnaître des signaux particuliers, tels que les PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes), les MAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes commensaux) et les DAMPs (motifs moléculaires associés au danger) [38]. Le premier type de PRR est un récepteur de type Toll-like (TLR), dont 10 ont été identifiés chez l'homme. Selon leur localisation dans la membrane plasmique ou dans l'endosome, ils vont assurer la perception de composants différents [39]. Le second type de PRR est un récepteur de type RIG-I like (RLR) qui assure la perception de l'ARN au sein du cytoplasme [40]. Trois récepteurs RLR ont été identifiés à ce jour : RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene I*) et MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) qui reconnaissent les petites ou les longues séquences d'ARN, respectivement, et Lgp2 (*Laboratory of genetics and physiology 2*) qui régule les deux autres récepteurs [40][41]. Le troisième type de PRR est le récepteur cGAS (*cyclic-GMP-AMP synthase*) qui est un senseur de l'ADN double brin viral localisé dans le cytosol. Enfin, le dernier type de PRR est le NLR (*NOD-Like Receptor*) dont 2 sous-familles principales existent : (1) NOD1 et NOD2 (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) qui reconnaissent des composants de la paroi bactérienne

et (2) les NLRP (*Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing*) qui détectent des DAMPs [42]. Ainsi, puisque tous ces récepteurs lient des ligands différents, ils initient une cascade de signalisation faisant intervenir des protéines adaptatrices distinctes. Néanmoins, toutes ces voies mènent à l'activation de facteurs de transcription aboutissant à la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, dont des interférons (**figure 6**) [43].

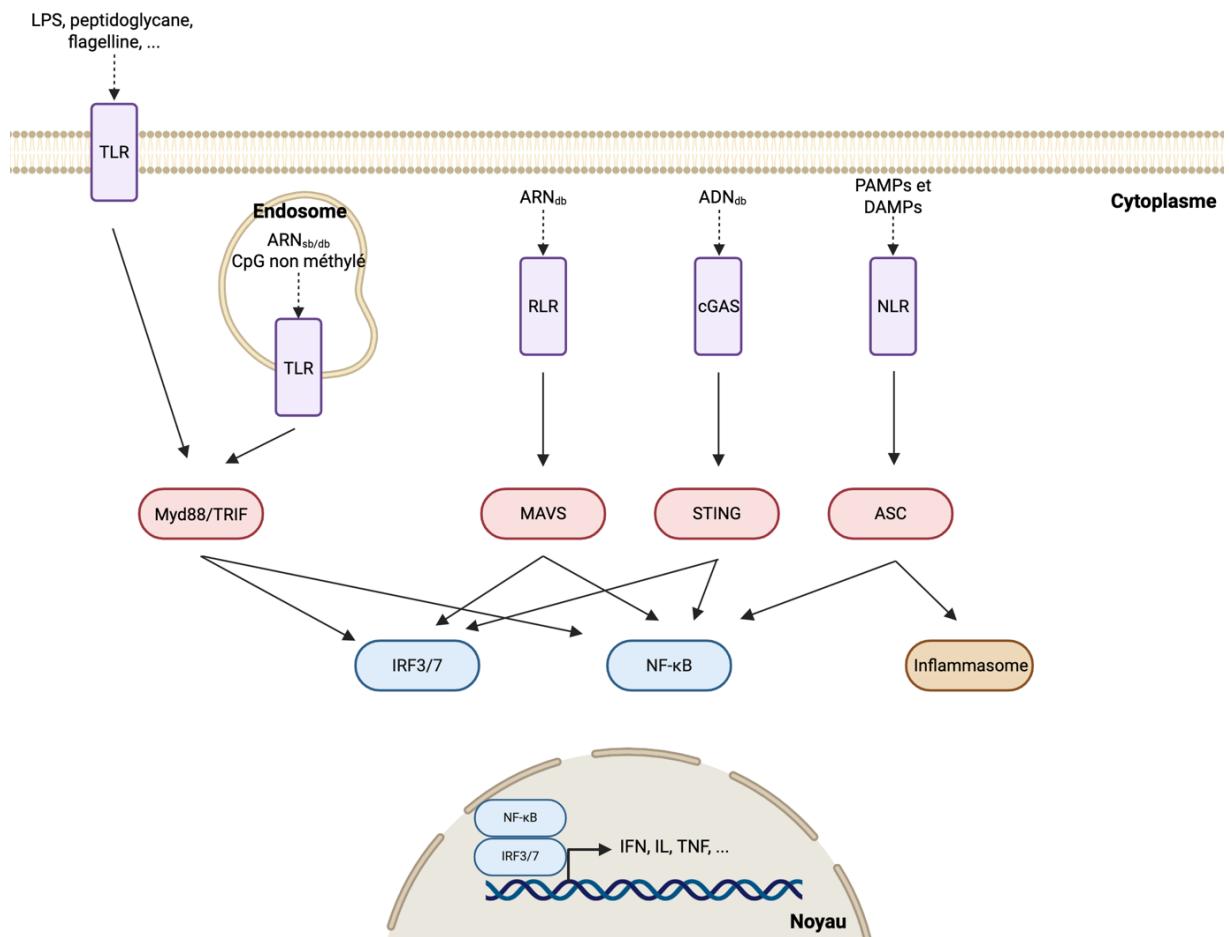


Figure 6 : Représentation schématique des PRR et de la signalisation de l'immunité innée. Les différents types de PRR (en violet) interagissent avec des PAMPs, des MAMPs et des DAMPs (flèches pointillées) et, par l'intermédiaire de protéines adaptatrices (en rouge), assurent l'activation de facteurs de transcription (en bleu). À la suite de la translocation nucléaire de ces facteurs de transcription, des cytokines pro-inflammatoires et des interférons seront libérés. Seuls les NLRs sont capables d'induire la formation d'un inflammasome (en orange). Image réalisée avec <https://www.biorender.com/> et inspirée de J. Shirley et al. (2020) [43].

b) Contournement de VZV

Lorsque l'immunité innée s'enclenche, plusieurs voies de signalisation aboutissent donc à la libération d'interféron (IFN) et de cytokines pro-inflammatoires. Cette libération permet la

limitation de la réPLICATION virale et le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'infection [37]. La production d'IFN est sous le contrôle de facteurs de transcription spécifiques, tels que IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*) et NF- κ B, et initie la production d'ISG (*Interferon Stimulated Gene*) via la signalisation JAK-STAT (*Janus tyrosine Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription*). Dès lors, VZV a développé plusieurs stratégies pour interférer avec ces différents composants [44]. En effet, VZV est capable d'altérer la production d'IFN, via notamment l'ORF61 qui initie l'ubiquitination et donc la dégradation de IRF3. De même, une des deux kinases du virus, ORF47p, est responsable d'une hyperphosphorylation de l'IRF3, empêchant son homodimérisation et donc sa translocation nucléaire [45]. En outre, le virus est également capable d'affecter la signalisation antivirale initiée par l'IFN, en particulier via l'expression de SOCS3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 3*) qui réduit la phosphorylation de STAT3 [44][46]. Enfin, VZV peut également interagir avec les cellules clés de l'immunité innée. En effet, les cellules dendritiques infectées par le virus voient l'expression de leur CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) diminuée, perturbant ainsi leur activité de présentation des antigènes aux lymphocytes T. De surcroît, la réponse antivirale innée est également limitée par l'infection des cellules dendritiques plasmacytoïdes présentes au niveau de la peau, inhibant ainsi la libération d'IFN- α [44].

4) Les granules de stress

a) Introduction sur les granules d'ARN

Afin de garantir un contrôle spatio-temporel et énergétique rigoureux des processus cellulaires, l'organisation des composants moléculaires est primordiale. À cette fin, la compartimentation est assurée par des organites pourvus d'une membrane, tels que le noyau ou les mitochondries, dont la composition est définie et régulée [47]. Toutefois, le contrôle du métabolisme de l'ARNm est assuré par des organites cytoplasmiques dépourvus de membrane lipidique, appelés granules d'ARN [48]. Ces dernières sont considérées comme des biocondensats moléculaires qui ne respectent pas une composition bien précise. Les principaux condensats sont les granules de stress (GS) et les p-bodies (PB), même si de nombreux autres types de granules sont rencontrés, tels que les corps de Cajal, les granules mRNP (ribonucléoprotéine messager) maternels dans les cellules germinales ou encore les

myogranules dans les muscles en développement [47][48]. Les GS sont formées transitoirement en réponse à certains stress cellulaires alors que les PB sont plutôt constitutifs, même si leur nombre et taille augmentent en réponse au stress [49]. La formation de ces deux types de biocondensats résulte d'un phénomène de condensation d'ARNm non traduits associés à des RBP (*RNA Binding Proteins*), incluant des complexes d'initiation de la traduction pour les GS ou des effecteurs de la dégradation des ARNm pour les PB [50][51]. Bien que la composition et la formation des GS et des PB soient différentes, ces derniers interviennent tous deux dans la régulation post-transcriptionnelle et la modulation du protéome via un contrôle de la traduction [49][50].

b) La réponse intégrée au stress (ISR)

Lors de la perception de certains facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques, une voie de signalisation, dénommée la réponse intégrée au stress (ISR), est enclenchée (**figure 7**). Ces facteurs incluent l'hypoxie, la privation en acides aminés ou en glucose, une infection virale et un stress du réticulum endoplasmique (RE) [52]. Ces conditions de stress sont perçues par une famille de protéines, appelées les kinases eIF2 α (*eukaryotic translation Initiation Factor*). Celles-ci sont différentiellement stimulées, mais toutes les voies convergent vers la phosphorylation de la sérine 51 de eIF2 α . Ces kinases sont les suivantes : (1) PKR (*Protein Kinase R*) qui détecte l'ARNdb viral, (2) PERK (*Protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase*) qui repère les stress du RE, (3) HRI (*Heme-Regulator Inhibitor*) qui reconnaît un stress oxydatif ou osmotique, un choc thermique ou la présence d'arsénite de sodium et (4) GCN2 (*General Control Non deppressible 2*) qui détecte une privation d'acides aminés [52]. Une fois activées, les kinases eIF2 α s'autophosphorylent et peuvent alors phosphoryler leur substrat. En revanche, seule la phosphatase PP1 (protéine phosphatase 1) assure la déphosphorylation de eIF2 α lors de la disparition du stress [53]. Lorsque ce facteur d'initiation de la traduction est phosphorylé, l'initiation de la traduction est bloquée. En effet, en l'absence d'un stress, eIF2B assure un recyclage du GDP (Guanosine Diphosphate) en GTP (Guanosine Triphosphate) de manière à initier la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-ARN_t^{Met}. Ce complexe s'associe à la sous-unité 40S du ribosome afin de générer le complexe de pré-initiation de la traduction (le complexe 43S). Enfin, ce complexe 43S se lie à l'ARNm, qui est lui-même en interaction avec le complexe eIF4F via sa coiffe, et la recherche du codon START est initiée.

Néanmoins, lorsque eIF2 α est phosphorylé, le recyclage du GDP en GTP par eIF2B est bloqué [54]. En conséquence, l'ISR est amorcée et entraîne une diminution globale de la traduction dépendante de la coiffe, tout en permettant le maintien de la synthèse de certaines protéines assurant le rétablissement et la survie des cellules grâce à des modes alternatifs d'initiation de la traduction, tels que les séquences IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) [54].

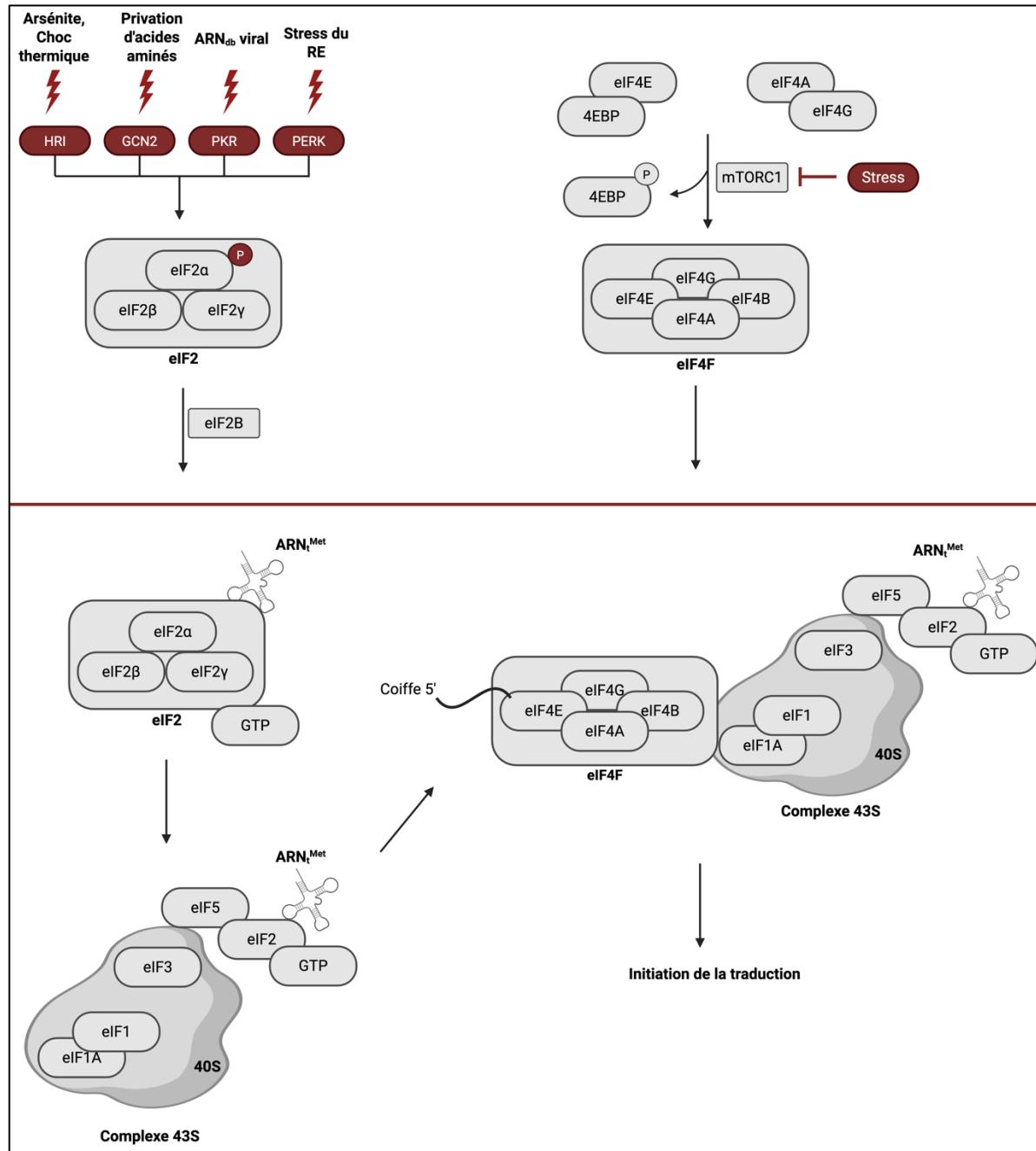


Figure 7 : Représentation schématique du processus d'initiation de la traduction et de la réponse intégrée au stress (ISR). En gris est représenté le processus d'initiation de la traduction et, en rouge, est représenté l'impact de différents stress sur ce processus. Certains stress peuvent stimuler des kinases (HRI, GCN2, PKR et PERK) qui ont pour fonction de phosphoryler eIF2 α . Cela a pour

conséquence d'empêcher la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-ARN_t^{Met} et d'empêcher l'initiation de la traduction. D'autres stress inhibent le complexe mTORC1, ce qui empêche l'assemblage du complexe eIF4F suite à l'absence de phosphorylation de 4EBP. Image réalisée avec <https://www.biorender.com/> et inspirée de M. Baymiller et al. (2022) [55] et de R. Jackson et al. (2010) [56].

Lorsque des stress, tels qu'un manque d'oxygène ou de nutriments, sont perçus par les cellules, un second mécanisme qui aboutit à l'inhibition du complexe mTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) est enclenché [57]. Ce complexe est impliqué dans la phosphorylation de nombreuses protéines, dont les protéines de liaison à eIF4E (4EBP, *4E Binding Protein*) [58]. En l'absence de la phosphorylation de 4EBP, son affinité pour eIF4E est accrue, empêchant ainsi l'assemblage du complexe eIF4F [54]. Ce complexe, formé de 3 sous-unités (eIF4E, eIF4A et eIF4G) est essentiel pour l'initiation de la traduction car il est responsable de l'assemblage du complexe de pré-initiation (PIC) sur la coiffe de l'ARNm [59](**figure 7**).

c) Assemblage des granules de stress

L'assemblage des granules de stress est un processus très rapide qui se déroule en plusieurs phases [60]. Par exemple, lors d'une stimulation à l'arsénite, ces GS sont déjà formées après 30 min. L'induction de l'ISR et l'arrêt global de la traduction qui en découle entraînent un désassemblage des polysomes menant à la libération de nombreux ARNm non traduits dans le cytosol. Ce phénomène constitue la première phase [47]. Dans ces conditions, de nombreuses RBP, telles que G3BP1 (*RasGAP-associated endoribonuclease 1*), TIA1 (*T cell Internal Antigen 1*), TIAR (*TIA-1 Related Protein*), Caprin1 et FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) entrent en interaction avec les ARNm libres. Ces interactions sont possibles via les domaines de liaison à l'ARN, les domaines intrinsèquement désordonnés (IDR) ou les domaines PLD (*Prion-Like Domains*) de ces protéines [54]. Leur liaison à l'ARN et la flexibilité de leurs domaines démontrent que ces RBP agissent comme de véritables nucléateurs dans la formation des GS [61]. Ces nombreuses interactions multivalentes sont à l'origine d'un phénomène de séparation de phase liquide-liquide (LLPS), ce qui sous-tend l'assemblage des GS [52]. La LLPS est une condition au cours de laquelle une solution homogène se sépare spontanément en 2 phases liquides distinctes de densités protéiques

différentes [62]. Cette compartmentalisation cellulaire aboutit à la formation d'organites dépourvus de membranes, tels que les GS qui ont une taille comprise entre 100 et 2000 nm [52][63]. Néanmoins, la LLPS peut être favorisée par divers facteurs, tels que les interactions macromoléculaires multivalentes (interactions protéine-protéine, protéine-ARN et ARN-ARN) et les interactions multivalentes faibles et transitoires entre les régions IDR (interactions π - π , cation-anion et dipôle-dipôle) [52]. Des petits condensats cytoplasmiques sont alors formés et ils constituent le cœur des GS. Ce phénomène d'agrégation primaire et de nucléation correspond à la deuxième phase de l'assemblage des GS [60]. Ensuite, un phénomène d'agrégation secondaire qui correspond à la phase 3 intervient. Au cours de cette étape, les GS peuvent fusionner entre elles et recruter d'autres protéines via les domaines IDR des RBP de manière à former des granules visibles au microscope. Enfin, les GS matures deviennent dynamiques et se désassemblent à la fin du stress via le processus inverse [54][60] (**figure 8**).

d) Composition et dynamisme des GS

Des études protéomiques ont démontré la présence de plus de 400 protéines dans les GS, dont la première moitié est constituée de RBP et les 50% restants de protéines impliquées dans divers processus cellulaires [64]. Néanmoins, la structure des GS n'est pas uniforme puisqu'elles sont constituées par un noyau central stable entouré par une enveloppe dynamique [52]. La région interne de ces granules contient le complexe de pré-initiation avec la sous-unité 40S du ribosome, des facteurs d'initiation de la traduction, des ARNm polyadénylés et des protéines nucléatrices (**figure 8**). En revanche, la région externe a une composition qui varie en fonction des échanges réalisés avec le cytosol ou d'autres compartiments cytoplasmiques, tel que les P-bodies. En effet, la longueur, l'intensité et le type de stress perçu influencent leur composition [49][60].

e) Désassemblage des GS

Contrairement à l'assemblage des GS qui est bien caractérisé et relativement rapide, les phénomènes qui sous-tendent au désassemblage sont moins bien définis (**figure 8**). Lors de la résolution ou de l'atténuation du stress, la traduction dépendante d'elF2 α est restaurée. Par conséquent, le pool d'ARNm non traduits diminue, réduisant la multivalence du réseau de

GS, et provoquant le désassemblage [47][52]. De plus, des PTM des RBP pourraient affaiblir ou renforcer les interactions multivalentes à l'origine du LLPS [61]. Par exemple, l'acétylation de G3BP1 lors de la disparition du stress semble réduire l'affinité de liaison de ce nucléateur pour l'ARN [47]. En outre, G3BP1 possède 2 partenaires de liaison qui sont en compétition : Caprin1 et USP10 qui peuvent promouvoir ou inhiber la condensation des GS, respectivement [51]. Enfin, d'autres phénomènes seraient impliqués dans le désassemblage de ces granules d'ARN, tels que l'autophagie, l'influence de protéines chaperonnes ou la dégradation des protéines des GS dépendantes du protéasome [64]. Néanmoins, le désassemblage des GS est indispensable au bon fonctionnement des cellules car des défauts dans ce processus ont été liés à diverses maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique ou encore la démence frontotemporale [65][66][67].

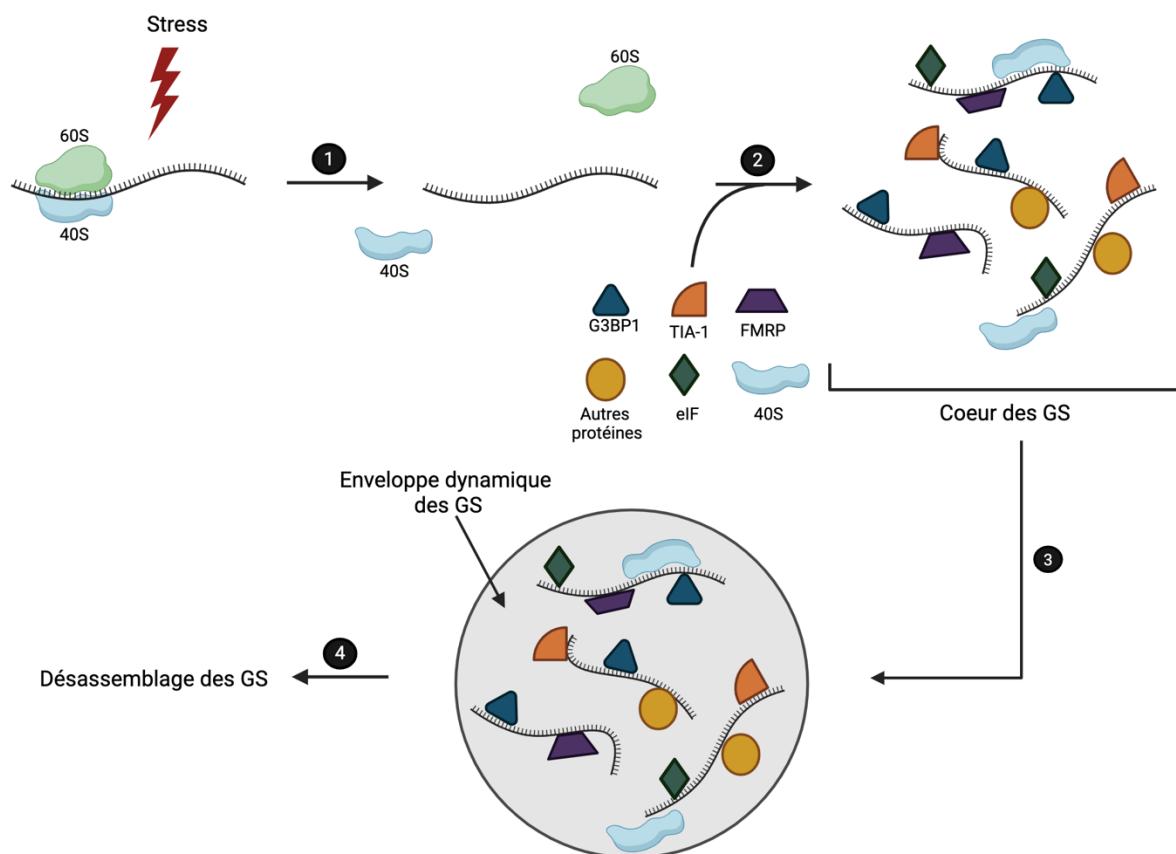


Figure 8 : Représentation schématique de l'assemblage des granules de stress. (1) Lorsque l'initiation de la traduction est bloquée suite à la présence d'un stress, les polysomes se désassemblent, libérant des ARNm non traduits dans le cytosol. (2) Par un phénomène d'agrégation primaire, les ARNm non traduits sont liés par de nombreuses protéines nucléatrices (G3BP1 en bleu foncé, TIA-1 en orange, FMRP en violet, d'autres protéines en jaune, des facteurs d'initiation de la traduction en vert foncé et la sous-unité 40S en bleu clair) de manière à former le cœur des GS. (3) L'agrégation secondaire assure

la formation d'une enveloppe dynamique permettant des échanges continus avec le cytosol. (4) Lorsque le stress disparaît, la traduction des ARNm reprend et les GS se désassemblent. Image réalisée avec <https://www.biorender.com/> et inspirée de Y. Guan et al. (2023) [60] et de A. Marcelo et al. (2021) [68].

f) Fonctions des GS

De nombreux rôles des GS ont été proposés car ces organites cytoplasmiques se situent au cœur du contrôle de la traduction, de la signalisation intracellulaire et de la réponse immunitaire innée antivirale. Dans un premier temps, la formation des GS est une conséquence de l'arrêt de la traduction dépendante d'eIF2 α médiée par l'ISR [69]. Toutefois, la séquestration de certains ARNm au sein des granules facilite leur tri. En effet, soit ces transcrits sont stockés dans les GS et sont protégés de la dégradation, soit ils sont transférés dans les PB de manière à être dégradés, assurant un véritable contrôle de la traduction [49][69]. Dans un second temps, les GS sont de véritables centres de signalisation puisqu'elles recrutent diverses protéines associées à différents processus, tels que le métabolisme, l'apoptose et la sénescence [49][61]. Un premier exemple est que les GS séquestrent RACK1 (*Receptor for Activated C Kinase 1*) qui est impliqué dans la voie p38/c-JUN N-terminal (JNK), dont l'activation conduit normalement à l'apoptose [49][69]. Un second exemple est que les GS internalisent TRAF2 (*TNF Receptor Associated Factor 2*), ce qui a comme conséquence de supprimer la réponse inflammatoire médiée par TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) [69]. Enfin, l'immunité innée antivirale est également influencée par ces biocondensats moléculaires. Les GS servent de véritables plateformes permettant de recruter les senseurs et les effecteurs de l'immunité innée, ce qui facilite la réponse antivirale [54][69]. De surcroît, les GS servent de sites de stockage des ARN viraux, empêchant ainsi la réPLICATION virale et menant à leur dégradation via la granulophagie lors du désassemblage des granules [54].

g) Résistance des virus face aux GS

Puisque les granules de stress sont associées à un état antiviral, les virus ont développé des stratégies visant à contrôler ces granules. Néanmoins, puisque chaque virus est caractérisé par un cycle de réPLICATION unique, l'impact des GS sur chaque virus est différent. 4 classes d'antagonistes de l'ISR ont été identifiées selon le mécanisme utilisé par le virus pour

interférer avec les GS [70]. Premièrement, les antagonistes de classe I interfèrent avec les kinases assurant la phosphorylation d'elf2 α . Pour ce faire, les virus peuvent capturer ou masquer l'ARNdb du virus pour empêcher sa détection par PKR, comme c'est le cas pour Influenza A. D'autres virus, comme l'Adénovirus, peuvent se lier directement à un monomère de PKR afin d'empêcher sa dimérisation et donc son activation [71][72]. Deuxièmement, les antagonistes de classe II empêchent la phosphorylation d'elf2 α . C'est le cas par exemple, des Poxvirus qui produisent des protéines permettant d'entrer en compétition avec elf2 α pour la liaison à PKR, empêchant ainsi la phosphorylation d'elf2 α [70]. Troisièmement, les antagonistes de classe III activent PP1 afin d'initier la déphosphorylation d'elf2 α , c'est notamment le cas de la protéine ICP34.5 de HSV-1. Quatrièmement, les antagonistes de classe IV inhibent l'interaction entre p-elf2 α et elf2B. Par exemple, un coronavirus qui infecte les bélugas (*Beluga whale coronavirus SW1*) code pour une protéine qui se lie à elf2B et assure ainsi la formation continue du complexe ternaire elf2-GTP-ARN_t^{Met} [70][73]. En plus des 4 antagonistes décrits ci-dessus, certains virus induisent puis inhibent les GS au cours de l'infection. En effet, l'orthoréovirus de mammifère induit la formation des GS par simple contact entre le virus et la cellule hôte. Ensuite, plus la synthèse des protéines du virus est à un stade avancé, et plus les granules se désassemblent, démontrant le contrôle du virus effectué sur les GS [74][71]. Le virus de l'hépatite C, quant à lui, induit la formation des GS par une voie dépendante d'elf2 α . Néanmoins, ce virus assure l'alternance entre l'assemblage et le désassemblage des granules au cours de l'infection. Cela lui permet d'améliorer sa survie au sein des cellules pour soutenir une infection chronique [71][72]. Enfin, certains virus contrôlent la composition des GS, tels que le poliovirus qui clive G3BP1 et dissocie ainsi TIA-1 des facteurs d'initiation de la traduction [72] ou le virus Ébola qui génère des corps d'inclusions viraux séquestrant certaines protéines des GS [75].

OBJECTIFS

Des résultats préliminaires obtenus au sein du laboratoire et non publiés ont démontré que le virus de la varicelle et du zona était à l'origine d'une inhibition de la formation des granules de stress. Plus précisément, le virus est responsable de cette inhibition lorsqu'un stress est induit par la thapsigargin qui cible la kinase PERK, mais également lorsque la kinase HRI est activée suite à un traitement à l'arsénite ou par un choc thermique. Néanmoins, après une stimulation par de l'ARN double brin synthétique activant la kinase PKR, aucune inhibition drastique des GS dans les cellules infectées n'a été observée. D'autres expériences ont également suggéré que VZV n'influencerait pas la phosphorylation d'elF2 α et que le processus d'inhibition des GS se produirait en aval de cette phosphorylation. L'objectif final du laboratoire est de caractériser la stratégie d'inhibition de la formation des GS utilisée par VZV. Dans cette optique, l'identification de la/des protéine(s) virale(s) responsable(s) de l'inhibition s'avère indispensable. Dans ce travail, 6 protéines virales non essentielles à la réPLICATION du virus et avec une cinétique d'expression précoce ont été étudiées selon une approche « perte de fonction ». Ainsi, des souches de VZV KO ont été générées pour ces 6 ORFs via la technique de clonage « en passant » afin d'infecter des ARPE-19. La capacité des cellules infectées à former, ou non, des GS lors d'une stimulation à l'arsénite a été évaluée. Ce criblage a été réalisé afin de déterminer si ces protéines jouent un rôle, ou non, dans l'inhibition des GS par VZV. Ces résultats permettront au laboratoire d'avancer dans la librairie visant à étudier les 71 ORFs du virus de manière à identifier un ou plusieurs gène(s) candidat(s).

En complément, l'étude de la cinétique d'inhibition des GS par VZV est cruciale pour la compréhension du mécanisme sous-jacent. À cet effet, l'influence d'un traitement à l'acide phosphonoacétique, qui interfère avec l'ADN polymérase virale, a été évaluée afin de déterminer si le phénomène d'inhibition des GS était dépendant de l'expression des gènes L. Enfin, la cinétique d'apparition des GS spontanées est également intéressante à explorer afin de déterminer précisément quand ces biocondensats moléculaire s'assemblent et quand le virus effectue son pouvoir inhibiteur.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) Culture cellulaire

a) Les lignées cellulaires

Les cellules ARPE-19 (*Arising Retinal Pigment Epithelia-19*) constituent une lignée cellulaire isolée de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) d'un homme de 19 ans. Elles ont été maintenues en culture dans un milieu DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*, réf. 31331028, Thermo FisherTM, GibcoTM, Massachusetts, USA) complémenté à l'aide de 10% de FBS (*Fœtal Bovine Serum*), 1% de pénicilline/streptomycine (réf. 15140122, Thermo Fisher ScientificTM, GibcoTM, Massachusetts, USA) et 1% d'acides aminés non essentiels (réf. 11140050, Thermo Fisher ScientificTM, GibcoTM, Massachusetts, USA).

Les cellules Mewo-Cre sont une lignée cellulaire de mélanome de type fibroblastique dérivées d'un homme de 78 ans et génétiquement modifiées afin d'exprimer la recombinase Cre. Les Mewo-Cre ont été cultivées dans un milieu MEM (*Minimum Essential Medium*, réf. 11095080, Thermo Fisher ScientificTM, GibcoTM, Massachusetts, USA) complémenté de la même manière que le DMEM-F12. Les cellules ont été cultivées dans un incubateur assurant le contrôle de la température (37°C) et du pourcentage de CO₂ (5%).

2) Génération des virus délétants : le clonage « en passant »

Le clonage « en passant » est une technique de mutagenèse qui exploite le système de recombinaison bactérien Red. Ce procédé a été utilisé afin d'introduire une mutation ponctuelle dans le génome de VZV dans l'intention de modifier un codon codant en un codon de terminaison. Dans cette optique, la souche GS1783 d'*Escherichia coli* contenant le génome de VZV sous la forme d'un BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) a été utilisée comme outil de clonage. Le BAC exprime à la fois la GFP (*Green Fluorescent Protein*) sous le contrôle d'un promoteur CMV (Cytomégalovirus) dans le backbone du BAC et la TdTomato sous le contrôle du promoteur SV40 entre l'ORF65 et l'ORF66, mais également un gène de résistance au chloramphénicol.

a) Électrocompétence des GS1783

Les bactéries GS1783, sensibles à la chaleur, ont systématiquement été cultivées à 32°C. Une pré-culture overnight a été réalisée dans du milieu Luria-Bertani (LB) contenant du chloramphénicol (Cm, 12,5 µg/mL) sous agitation (220 rpm). Un nouveau milieu de LB-Cm a été inoculé avec la pré-culture selon un ratio 1:50. L'incubation s'est déroulée à 32°C et sous agitation jusqu'à ce que les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance. Cette dernière est définie par une valeur d'absorbance mesurée à 600 nm de 0,5-0,6. La culture a ensuite été transférée pendant 15 min dans un bain-marie à 42°C et 220 rpm afin d'activer le système de recombinaison Red, puis refroidie dans un bain glacé pendant 5 min. Les bactéries ont été culotées par une centrifugation à 4500 rcf pendant 10 min. Ensuite, trois lavages ont successivement été réalisés : le premier avec 25 mL d'eau stérile froide et les deux suivants avec 25 mL puis 1,5 mL de glycérol 10% stérile. Ces lavages ont été réalisés par centrifugation à 3500 rcf pendant 10 min suivis de la resuspension du culot bactérien avec la solution correspondante. Finalement, les bactéries ont été resuspendues dans le glycérol 10% stérile de manière à obtenir un volume final de 100 µL.

b) Génération de la cassette PCR

Afin de générer la cassette de recombinaison contenant la mutation d'intérêt, une PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a été réalisée sur base d'un plasmide pEP_KanS2 (**figure S1**). Les amorces (**tableau S1**) utilisées pour la PCR contiennent, successivement : (i) une séquence homologue à une région du génome de VZV située en amont du codon à muter (30 nt) ; (ii) une séquence portant la mutation d'intérêt (30 nt) et qui, sera présente de part et d'autre du gène de résistance après la PCR et qui permettra la seconde recombinaison et (iii) une séquence homologue à la cassette d'expression du gène de résistance à la kanamycine (25 nt) permettant l'amplification par PCR (**figure S2a**).

La génération de la cassette contenant la mutation à intégrer dans le BAC VZV WT-tdTomato (*Wild-type*) s'est déroulée via une PCR en deux étapes (**tableau S2**). Le mélange PCR est constitué par 32 µL d'eau exempte de nucléase, 10 µL du tampon réactionnel (*Promega*

Green GoTaq reaction buffer, réf. M791A , PromegaTM, Madison, USA), 4 µL d'un mix de désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP, 200 µM), 1,25 µL de chaque amorce (sens et anti-sens, chacune à 10 µM), 0,5 µL de la polymérase (*Promega GoTaq G2 DNA polymerase*, réf. M784B, PromegaTM, Madison, USA) et 1 µL de pEP_KanS2 (50 ng/µL). Au terme de la réaction de PCR, la taille de la cassette synthétisée a été vérifiée sur un gel d'agarose 1%.

Les produits PCR ont ensuite été digérés pendant 2h à 37°C à l'aide de l'enzyme de restriction *DpnI* afin d'éliminer le plasmide modèle (pEP-KanS2)(**figure S2b**). La cassette a été purifiée via un kit de Macherey-Nagel (*NucleoSpin Gel and PCR clean-up*, réf. 740609.250, Macherey-NagelTM, Düren, Allemagne) avant de réaliser un dosage à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type NanoDrop (*Nanophotometer® N50/60*, ImplenTM, Munich, Allemagne).

c) Électroporation et première recombinaison Red

En vue d'introduire la cassette générée par PCR dans le BAC VZV WT-tdTomato des bactéries GS1783, une électroporation a été réalisée (**figure S2c**). Cette étape s'est déroulée en mettant en présence 100 µL de bactéries GS1783 électrocompétentes avec 100 à 200 ng de produit PCR dans les conditions suivantes : 17,5 kV/cm, 25 µF et 200 Ω. Ensuite, la régénération s'est déroulée pendant 1h à 32°C et 220 rpm dans un milieu LB-Cm. Pour terminer, 100 et 700 µL des bactéries électroporées ont été étalées sur des boîtes de Petri contenant du milieu gélosé avec du LB, du chloramphénicol (12,5 µg/ml) et de la kanamycine (kana, 25 µg/mL). Après une incubation de 24 à 48h à 32°C, les colonies bactériennes présentes sur le milieu gélosé sont potentiellement porteuses de la cassette d'intérêt puisqu'elles l'ont intégrées via une première recombinaison Red et sont donc appelées des « clones parents ».

d) PCR sur colonie des clones parents

Afin de vérifier l'intégration correcte de la cassette dans le BAC VZV WT-tdTomato des GS1783, une PCR (**tableau S3**) a été réalisée directement sur les colonies bactériennes résistantes à la kanamycine. Les colonies ont d'abord été repiquées et laissées pendant 24h à

32°C dans une plaque 96 puits contenant 100 µL de LB-Cm-Kana. Le mélange PCR a été préparé de la manière suivante : 15,625 µL d'eau exempte de nucléases, 5 µL du tampon réactionnel (*Promega Green GoTaq reaction buffer*, réf. M791A , Promega™, Madison, USA), 2 µL de dNTP (200 µM), 0,625 µL de chaque amorce (une amorce ciblant le gène de résistance à la kanamycine et une amorce ciblant la séquence virale, chacune à 10 µM)(**tableau S1**), 0,125 µL de la polymérase (*Promega GoTaq G2 DNA polymerase*, réf. M784B, Promega™, Madison, USA) et 1 µL de suspension bactérienne. La taille du produit PCR a été vérifiée sur un gel d'agarose 1% et une pré-culture overnight (220 rpm à 32°C) a été réalisée pour les clones positifs dans du milieu LB-Cm-Kana.

e) Deuxième recombinaison Red

Les clones parents sélectionnés après la PCR ont été inoculés dans un nouveau milieu LB-Cm (2,5 mL de LB Cm et 100 µL de la pré-culture). Les bactéries ont ensuite été incubées jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne une valeur de 0,4-0,5, signifiant que la phase logarithmique précoce est atteinte. Ensuite, 2,5 mL d'un milieu LB-Cm contenant 1% d'arabinose a été ajouté à la culture bactérienne qui est à nouveau incubée pendant 50 min à 32°C et 220 rpm. Cette étape permet d'induire l'expression de l'endonucléase *I-SceI* qui réalise une coupure au niveau de son site de restriction, ce qui a comme conséquence de linéariser le BAC (**figure S2d**). Ensuite, la culture bactérienne a été transférée dans un bain-marie à 42°C pendant 15 min afin d'induire une seconde recombinaison Red (**figure S2e**). Par conséquent, la cassure double brin induite par l'endonucléase est réparée via recombinaison homologue et le gène de résistance à la kanamycine est éliminé lorsque les bactéries sont placées à 32°C pendant 3h. Enfin, des dilutions à 10⁻⁵ et 10⁻⁶ de la solution bactérienne ont été étalées sur des boîte de Petri contenant du milieu gélose avec du LB, du chlorampénicol et 1% d'arabinose. Après une incubation de 24 à 48h à 32°C, les colonies bactériennes présentes sur le milieu gélosé sont potentiellement porteuses de la mutation d'intérêt mais dépourvue du gène de résistance à la kanamycine puisqu'elles ont subi successivement une cassure par *I-SceI* et une 2^{ème} recombinaison Red. Ces dernières sont donc appelées des « clones enfants » (**figure S2f**).

f) PCR sur colonie des clones enfants

De chaque clone parent, 24 clones enfants ont été repiqués en culture liquide à la fois sur une plaque contenant du LB-Cm et sur une plaque contenant du LB-Cm-Kana puis incubés pendant 24h à 32°C. Le lendemain, les clones enfants qui ont poussés sur la plaque LB-Cm mais qui n'ont pas poussé sur la plaque contenant la kanamycine ont été amplifiés par PCR (dans les mêmes conditions que la PCR sur colonie des clones parents, à l'exception des amorces qui ne ciblent que la séquence virale)(**tableau S3**). À nouveau, la taille de la cassette a été contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% afin de vérifier l'absence de la séquence correspondant au gène de résistance à la kanamycine. Enfin, 4 produits PCR des clones enfants ont été purifiés via le kit Macherey-Nagel Nagel (*NucleoSpin Gel and PCR clean-up*, réf. 740609.250, Macherey-Nagel™, Düren, Allemagne) puis envoyés au séquençage pour vérifier la présence de la mutation d'intérêt.

3) Génération des virus délétants : maxi-préparation de BAC sur un gradient de chlorure de césium

Afin de produire en grande quantité et de purifier les BAC produits par le clonage « en passant », une maxi-préparation sur un gradient de chlorure de césium a été opérée.

a) Amplification et extraction du BAC

Pour générer une biomasse importante, et ainsi amplifier le BAC d'intérêt, une pré-culture overnight à 32°C de bactéries GS1783 contenant le BAC a été réalisée dans 500 mL de LB contenant du chloramphénicol (12,5 µg/mL) sous agitation (220 rpm). Le lendemain, les bactéries ont été centrifugées 10 min à 6000 g et le culot a été resuspendu dans 50 mL d'une solution P1 (Tris 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, RNase 100 µg/mL). Ensuite, 50 mL d'une solution P2 (NaOH 200 mM, 1% SDS) ont été ajoutés et une incubation de 5 min à température ambiante a été nécessaire afin d'initier la lyse bactérienne et la dénaturation de l'ADN. À cet ensemble ont été ajoutés 50 mL d'une solution P3 (acétate de potassium 3M pH 5,5), qui assure la neutralisation brutale du milieu. Le mélange a été incubé pendant 15 min sur glace puis centrifugé pendant 15 min à 6000 rcf. Dans ces conditions, l'ADN chromosomique, les protéines et d'autres composants cellulaires sont précipités et le surnageant, contenant le

BAC, a été filtré. Dès lors, les acides nucléiques du filtrat ont été précipités en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol et une nouvelle centrifugation à 8000 rcf pendant 10 min a été effectuée. Enfin, le culot résultant a été égoutté pendant 10 min sur du papier absorbant.

b) Élimination des ARN résiduels

L'ADN plasmidique a été remis en solution dans 6 mL d'eau stérile avec 4 mL d'acétate d'ammonium (5 M). Cette importante concentration en sel assure la précipitation de certains contaminants, notamment l'ARN, et nécessite une incubation de 1h sur glace. Subséquemment, la solution a été centrifugée 10 min à 8000 rcf et 0,7 volume d'isopropanol a été additionné au surnageant. Une centrifugation supplémentaire a été réalisée afin de culoter l'ADN d'intérêt et le culot a été égoutté pendant quelques minutes.

c) Purification de l'ADN sur un gradient de chlorure de césium

Une fois sec, le culot a été resuspendu dans 4 mL d'une solution TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Cette solution a ensuite été transférée dans un autre *falcon* contenant 4g de chlorure de césium. Une fois ce dernier dissous dans la solution, 400 µL de bromure d'éthidium (10 mg/mL) ont été ajoutés. Une centrifugation à 3000 rcf pendant 15 min a été effectuée et la solution clarifiée a été transférée dans un tube compatible avec le rotor VTi 65.2. Pendant la nuit, une ultracentrifugation a été exécutée (45000 rcf pendant 16 à 20h et 18°C) de manière à séparer les différents types d'ADN selon leur densité isopycnique. Après avoir visionné sous UV la bande correspondant à l'ADN superenroulé, l'extraction s'est déroulée par piquage dans le tube à l'aide d'une seringue de 1 mL. Le bromure d'éthidium a été éliminé via un processus d'extraction volume/volume avec de l'alcool isoamylque en réalisant 4 à 5 lavages suivis d'une centrifugation de 2 min à 9000 rcf. Trois volumes d'eau ont ensuite été ajoutés à la phase contenant l'ADN et un ajout de 8 volumes d'éthanol assure la précipitation de cet acide nucléique. Une première centrifugation de 10 min à 8000 rcf permet d'éliminer l'éthanol et l'eau, puis le culot est resuspendu dans 5 mL d'éthanol 70% pour éliminer les résidus de sels et les impuretés, et une deuxième centrifugation à 8000 rcf pendant 15 min permet de culoter l'ADN. Le culot a été séché pendant 30 min sur du papier absorbant puis a été remis en

solution dans 200 à 500 µL de Tris (10 mM pH 8) avant de doser l'ADN au Nanodrop (*Nanophotometer® N50/60*, Implen™, Munich, Allemagne).

4) Transfection

Dans le but d'initier une infection dans des ARPE-19 à partir du génome viral exprimé dans les BAC, une transfection a été réalisée au sein de Mewo exprimant la recombinase Cre. En effet, les BAC délétants réplicatifs expriment à la fois la TdTomato et la GFP. L'expression de deux marqueurs étant inutile et le backbone du BAC étant flanqué de sites LoxP, la recombinase Cre assure l'excision du backbone contenant notamment la GFP. Une fois la GFP éliminée, l'infection des ARPE-19 a été réalisée par co-culture avec les Mewo-Cre.

Des Mewo-Cre ont été ensemencées à 80% de confluence dans des plaques 6 trous, puis la solution de transfection a été réalisée en préparant 2 mélanges. Dans le premier tube, 3 µg de BAC ont été remis en solution dans 100 µL de milieu MEM sans sérum. Sachant que le ratio ADN:transfектант doit être de 1:1,5, le second tube contient 4,5 µL de polyéthylèneimine (PEI) dans 100 µL de milieu MEM sans sérum. La solution contenant le PEI a ensuite été déposée sur la solution contenant l'ADN, puis le mélange a été incubé pendant 20 minutes à température ambiante. Enfin, le mélange ADN/PEI a été déposé goutte à goutte sur les Mewo-Cre et la transfection s'est déroulée pendant 48h à 37°C et 5% de CO₂. Une fois la transfection terminée, les cellules ont été transférées dans des flasques (T25) puis passées tous les deux jours jusqu'à l'apparition des foyers d'infection d'une part et jusqu'à disparition de la fluorescence verte d'autre part. Pour terminer, des cellules Mewo-Cre infectées ont été mise en contact avec des cellules ARPE-19 à un ratio 1:25 afin que l'infection puisse se propager au sein de cette lignée cellulaire. Les ARPE-19 infectées ont ensuite été passées tous les deux jours jusqu'à élimination des MeWo-Cre.

5) Extraction d'ADN génomique

De manière à vérifier que la mutation d'intérêt ait correctement été intégrée dans les ARPE-19, une extraction de l'ADN génomique à partir des cellules infectées par les différentes souches de VZV KO a été effectuée.

Tout d'abord, les cellules ont été grattées dans du PBS puis centrifugées 5 min à 12000 rpm afin d'éliminer la solution saline. Le culot obtenu a été resuspendu à l'aide de 300 µL de tampon de lyse (Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, 0,4% SDS) et 3 µL de protéinase K. La solution a été incubée pendant 3h à 55°C puis transférée dans un *Eppendorf Phase Lock Gel* (réf. 2302800, 5PRIME™, Montréal, Canada) pour y ajouter 300 µL d'un mix phénol-chloroforme-alcool isoamylique. Le tube a été placé sur un portoir rotatif pendant 10 min puis centrifugé 5 min à 14000 rpm. La phase du haut a été transvasée dans un nouvel *Eppendorf Phase Lock Gel* avec 300 µL de chloroforme pur afin d'éliminer les résidus de phénol. À nouveau, une rotation a été effectuée pendant 5 min puis la solution a été centrifugée 5 min à 14000 rcf. La phase du haut contenant l'ADN a été extraite puis 30 µL d'acétate de sodium et 600 µL d'éthanol 100% ont été ajoutés pour faire précipiter l'ADN. Une centrifugation à vitesse maximale pendant 10 min a permis de culoter l'ADN qui a été lavé à l'aide d'éthanol 70% puis resuspendu avec du tampon TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1mM) pendant au moins 1h. L'ADN génomique a ensuite été amplifié par PCR (**tableau S3**) et la taille des amplicons a été vérifiée sur un gel d'agarose 1%. Enfin l'ADN génomique a été purifié puis envoyé au séquençage.

6) Western-blot

Afin de vérifier que les protéines encodées par l'ORF1, l'ORF3 et l'ORF58 ne sont pas exprimées dans les cellules infectées par les souches de VZV KO, un western-blot a été réalisé. La vérification de l'absence d'expression pour l'ORF36, l'ORF59 et l'ORF65 n'a pas été possible puisqu'aucun anticorps n'est disponible sur le marché.

a) Extraction des protéines

Une lyse directe a été réalisée à l'aide de TR1X (Tris HCl 60 mM, glycérol 10%, SDS 2,5%, β-mercaptopéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,001%) sur des ARPE-19 infectées par VZV WT, VZV Δ1, VZV Δ3 et VZV Δ58. Par la suite, les échantillons ont été traités pendant 30 min sur glace à l'aide de benzonase. Les extraits protéiques ont été congelés à -20°C lorsqu'ils n'étaient pas immédiatement chargés sur le gel d'électrophorèse.

b) Préparation du gel d'électrophorèse, migration des extraits protéiques et transfert

Un gel de polyacrylamide a été utilisé afin d'assurer la séparation des protéines par SDS-PAGE. Puisque les protéines étudiées présentent un faible poids moléculaire, un gel de migration de polyacrylamide à 14% (acryl 40%, Tris HCl pH 8,8, H₂O, glycérol 50%, SDS 10%, APS 10%, TEMED) ainsi qu'un gel de concentration (acryl 40%, Tris HCl pH 6,8, H₂O, SDS 10%, APS 10% TEMED) ont été coulés. Les échantillons (40 µL) ont été chargés dans les puits et la migration s'est déroulée en 2 temps dans un tampon de migration 1X (30g Tris, 72g glycine, 5g SDS) : 70 V lorsque les échantillons sont dans le gel de concentration, puis 120 V lorsqu'ils ont atteints le gel de migration. Au moment où la migration s'est terminée, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène, préalablement activée dans du méthanol) à l'aide d'un tampon de transfert (méthanol, Tris, glycine) en chambre froide, soit à 400 mA pendant 1h15, soit à 40 mA pendant la nuit. Enfin, des lavages à l'eau désionisée ont été réalisés avant de colorer la membrane de PVDF au rougeponceau afin de vérifier la qualité du transfert.

c) Marquage des protéines d'intérêt et révélation

Après avoir découpé les membranes, ces dernières ont été saturées pendant 1h sous agitation à l'aide de lait 3% dilué dans du TBS-Tween (Tris, NaCl, Tween pH 7,6). Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires (**tableau S4**) dilués dans la même solution que pour l'étape de saturation, pendant 3h. Après 2 lavages de 5 min dans du TBS-Tween, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires (**tableau S4**) dilués dans la solution de TBS-Tween-lait 3% pendant 1h. Enfin, 3 lavages de 5 min dans du TBS-Tween ont été effectués et les membranes ont été révélées par chimioluminescence à l'aide d'une solution constituée d'un réactif A (Tris HCl 0,1 M pH 8,6, luminol), d'un réactif B (DMSO, acide para-hydroxycoumarique) et d'un réactif C (H₂O₂). La machine de révélation est le système d'imagerie ImageQuantTM LAS4000 (GE Healthcare, Chicago, USA).

7) Cinétique d'inhibition des GS par VZV

Afin d'identifier la cinétique d'inhibition des GS par VZV, un traitement à l'acide phosphonoacétique (PAA) a été réalisé à différents moments de l'infection virale. En effet, ce composé antiviral interfère avec la réPLICATION DES HERPÈSVIRUS en bloquant l'activité de l'ADN polymérase virale. L'effet de ce composé antiviral a tout d'abord été vérifié en évaluant la croissance virale pendant 72h d'infection. En parallèle, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées en marquant G3BP1 et IE63. De plus, les particules libres permettant d'infecter les cellules sont issues d'une souche de VZV WT exprimant la GFP.

a) Production des particules libres de VZV

3 jours avant l'expérience, 2 boîtes de 35mm ont été ensemencées avec des ARPE-19 infectées à 1/10 de la surface à l'aide d'une souche de VZV WT exprimant la GFP. L'incubation s'est déroulée pendant 72h à 37°C et 5% de CO₂ avant de lancer le protocole de production des particules libres le jour de l'expérience. À cette fin, les cellules infectées ont été grattées dans 6 mL de PGSC (PBS-sucrose-glutamate-sérum) puis soniquées à amplitude minimale (20%) selon le protocole suivant : 3 impulsions de 15 secondes séparées par 15 secondes de repos.

b) Infection et traitement des cellules

La veille de l'expérience, des ARPE-19 ont été ensemencées dans des plaques 6 trous à une confluence de 85% pour les expériences de croissance virale, ainsi que dans des plaques 24 trous à une confluence de 80% pour les expériences d'immunofluorescence. Le jour de l'expérience, 1000 PFU de particules libres fraîches de VZV WT-GFP ont été déposées sur les cellules. L'infection s'est déroulée en centrifugeant les plaques à 1000 g pendant 15 min à 4°C puis en réalisant une incubation à 37°C pendant 45 min. Au terme de l'infection, 2 rinçages au PBS ont été effectués puis le milieu des trous non traités a été remplacé par du milieu frais alors que le milieu des trous traités a été remplacé par du PAA à une concentration de 0,5 ou 1 mg/mL, dont le pH de la solution a été ajusté au pH du milieu.

c) Croissance virale

À la suite de l'infection des cellules, la plaque 6 puits a été transférée dans l'Incucyte® (*Incucyte® S3 Live-Cell Analysis Instrument*, Sartorius™, Göttingen, Allemagne) afin d'évaluer l'impact d'un traitement au PAA sur la croissance virale. Les images ont été obtenues en contraste de phase ainsi qu'en fluorescence afin de visualiser la GFP. L'acquisition d'images s'est déroulée toutes les 2h au cours des 24 premières heures suivant l'infection, puis 1 image a été obtenue à 48h et à 72h d'infection. Le logiciel de l'Incucyte® a déterminé la surface occupée par la fluorescence verte dans chaque puit et à chaque intervalle de temps afin de générer une courbe de croissance virale.

8) Immunofluorescence

Afin de visualiser l'effet de la délétion de certaines protéines virales sur l'inhibition des granules de stress, une immunofluorescence a été réalisée par marquage de G3BP1. L'étude de la cinétique d'inhibition des GS par VZV, quant à elle, a été accomplie à l'aide d'un marquage de G3BP1 et de la protéine virale IE63 après différents temps post-infection (4, 6, 8, 10, 12 et 14h).

a) Ensemencement des ARPE-19 et induction du stress

Dans une plaque 24 puits, des lamelles de verre ont été déposées stérilement puis lavées rapidement à l'éthanol et rincées au PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Ensuite, les ARPE-19 infectées et non infectées ont été ensemencées selon la confluence désirée (80% de cellules et 10% de cellules infectées). Pour que l'infection puisse se propager, la plaque a été incubée pendant 24h à 37°C et 5% de CO₂ (ou pendant 45 min pour les expériences de cinétique). Afin d'induire un stress médié par HRI, les cellules ont été traitées à l'aide d'une solution d'arsénite de sodium diluée à 1 mM dans le milieu de culture (DMEM-F12) pendant 30 min.

b) Fixation, perméabilisation et saturation

Dès l'instant où le traitement de 30 min est terminé, le milieu de culture a été aspiré et la fixation des cellules a été assurée à l'aide d'une solution de PAF 4%-PBS

(paraformaldéhyde) pendant 10 min. Ensuite, la perméabilisation des cellules a été réalisée avec une solution de PBS - Triton 0,1% pendant 5 min. L'étape de saturation, quant à elle, a duré 1h à l'aide d'une solution de PBS - Triton 0,1% - BSA 5% (*Bovine Serum Albumine*). Toutes les étapes se sont réalisées à température ambiante et sous agitation.

c) Immunomarquage

Dans l'objectif de réaliser un immunomarquage, les anticorps primaires (**tableau S5**) ont été dilués dans la solution de saturation puis incubés pendant la nuit. Deux lavages de 5 min dans du PBS ont ensuite été réalisés et l'incubation avec les anticorps secondaires (**tableau S5**) a été effectuée pendant 1h30. Deux lavages ont été accomplis : le premier dans du PBS pendant 5 min et le second dans de l'eau désionisée pendant quelques secondes. Enfin, la coloration des noyaux a été assurée avec une solution de Hoeschst (1/50.000) pendant 5 min, suivie de 3 lavages de 10 min à l'eau désionisée. Toutes les étapes se sont réalisées à température ambiante, sous agitation et à l'obscurité, à l'exception de l'incubation avec l'anticorps primaire.

d) Montage des lames et acquisition des images

Une fois que l'immunomarquage est clôturé, le montage des lamelles de verre a été réalisé sur des lames porte-objets à l'aide de 10 µL de Mowiol préalablement chauffé à 65°C. Les lames ont ensuite été séchées pendant 24h à l'obscurité avant de pouvoir être observées au microscope confocal (Zeiss LSM980 Airyscan). Les lames ont été observées à l'aide d'un objectif 40x avec de l'huile à immersion. Pour chaque condition, environ 150 cellules infectées ont été capturées selon un Z-stack, puis les images ont été traitées via une projection orthogonale sur le logiciel ZEN Blue lite (version 3.12). Pour les expériences de cinétique d'inhibition des GS par VZV, toutes les cellules infectées ont été capturées puisque le taux d'infection était très faible. Pour chaque image, les cellules ont été classées en différentes catégories et comptées à l'aide du logiciel QuPath (version v0.5.1) : les cellules non infectées (NI) ou non infectées autour des cellules infectées (I-) ou infectées (I+), avec (GS+) ou sans (GS-) granules de stress. Les résultats du comptage ont été rapportés sur un graphique réalisé à l'aide de GraphPad Prism (version 10.3.1) et un t-test non pairé a été réalisé.

RÉSULTATS

1) Inhibition des granules de stress par le virus de la varicelle et du zona

La formation des granules de stress est un processus essentiel dans la lutte contre les infections virales. De fait, de nombreux virus ont développé des stratégies visant à interférer avec la formation et/ou la fonction de ces biocondensats moléculaires. Des données préliminaires non publiées obtenues au sein du laboratoire indiquent que le virus de la varicelle et du zona est capable d'inhiber la formation de ces granules. De manière à illustrer ce phénomène d'inhibition des GS, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur des ARPE-19 infectées ou non par la souche WT du virus en marquant G3BP1, qui est la principale protéine nucléatrice de ces biocondensats moléculaires. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de cellules positives aux GS.

Dans un premier temps, lorsque les cellules n'ont subi aucun traitement, le signal G3BP1 observé est diffus dans le cytoplasme (**figure 9a**). Dans les cellules non infectées provenant d'une lame où aucune infection n'est présente (NI), le pourcentage de cellules positives aux GS est pratiquement nul (**figure 9b**). Dans les cellules infectées (I+), ce pourcentage est très faible, mais est légèrement supérieur par rapport aux NI, puisqu'il est de l'ordre de 1 à 4% (**figure 9b**). L'infection représente un stress pour les cellules, d'où l'apparition de quelques GS spontanées, qui se forment en l'absence de traitement à l'arsénite (**flèche jaune, figure 9a**). Dans un second temps, lorsqu'un traitement à l'arsénite 1 mM est appliqué sur les cellules pendant 30 min, G3BP1 se condense dans le cytoplasme et de nombreuses GS sont observées (**figure 9a**). Dans ces conditions, il est clair que le taux de formation des granules de stress est quasiment maximal (entre 91 et 99%) dans les cellules NI. À l'inverse, les GS sont fortement inhibées lorsque les ARPE-19 sont infectées par le virus WT, puisque le taux de cellules positives aux GS est compris entre 2 et 4% (**figure 9b**). Ces données permettent donc de mettre en évidence le pouvoir inhibiteur de VZV par rapport aux GS lorsqu'un traitement à l'arsénite a été réalisé sur des ARPE-19 infectées par co-culture avec la souche WT du virus. Enfin, il a été constaté qu'en présence d'arsénite, les cellules non infectées présentes aux abords des cellules infectées (I-) ont un pourcentage de cellules positives aux GS qui est

systématiquement plus faible que dans les cellules NI (**figure S3**), ce qui suggère un effet de l'infection sur les cellules avoisinantes.

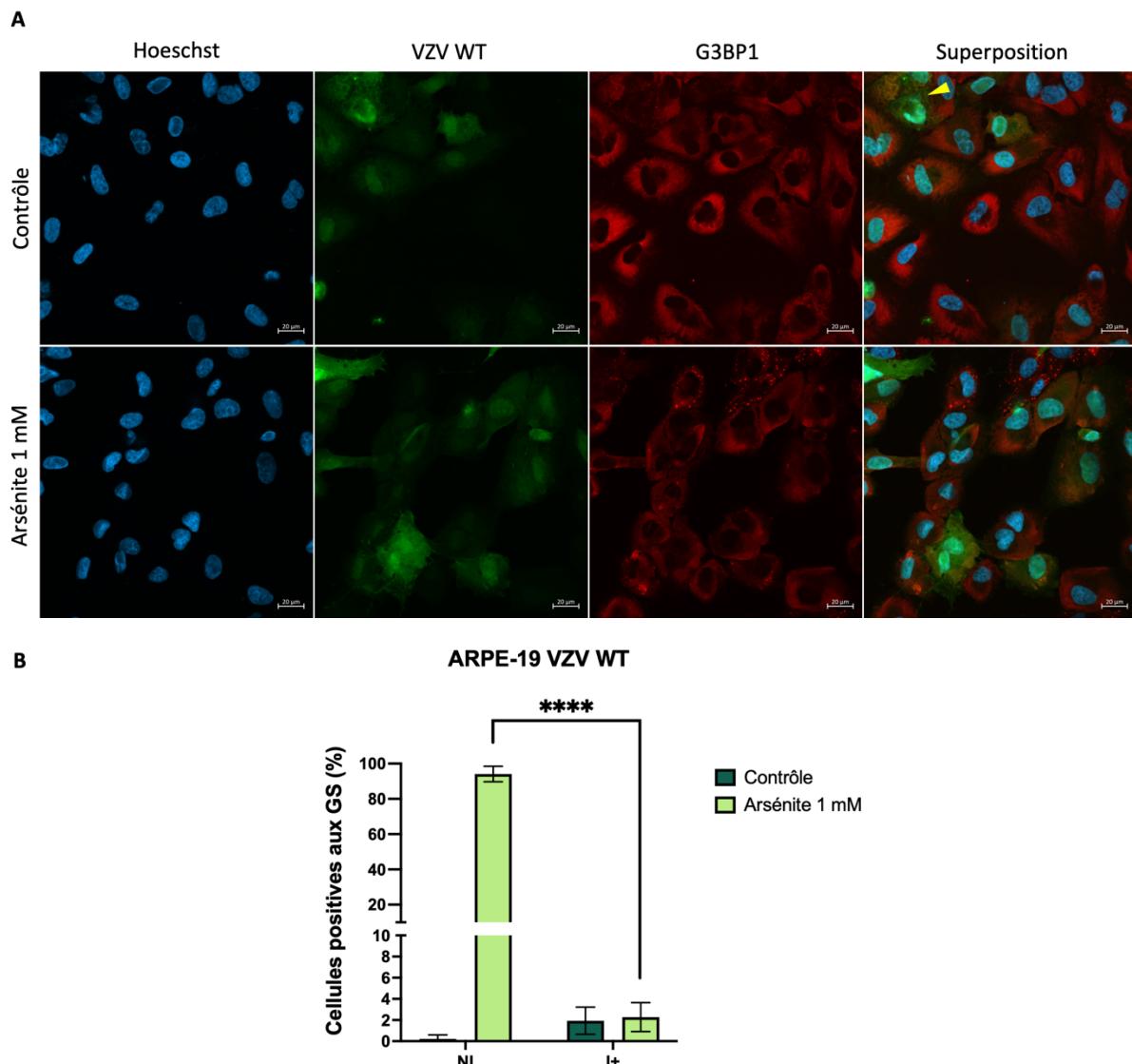


Figure 9 : Inhibition des granules de stress par VZV WT. (A) Immunofluorescence anti-G3BP1 (représenté en rouge) de ARPE-19 infectées par la souche WT de VZV, non traitées (contrôle) ou traitées à l'arsénite de sodium (1 mM pendant 30 min). Les noyaux sont marqués au Hoeschst (représenté en bleu) et la souche sauvage de VZV exprime la protéine fluorescente Td-Tomato (représentée en vert). Pour chaque condition, un z-stack a été réalisé, avec des acquisitions d'images toutes les 50 µm. La flèche jaune indique la présence de GS spontanées. (B) Pourcentage de cellules positives aux GS dans les cellules non infectées (issues d'une lame dépourvue d'infection, NI) et infectées par VZV WT (I+), dans des conditions de contrôle (en vert foncé) ou de traitement (en vert clair). Au total, 150 cellules I+ ont été comptées et les cellules sont considérées comme positives aux GS lorsqu'elles en possèdent au moins 5. L'expérience a été réalisée 6 fois et un t-test non pairé a été effectué (**p<0,0001).

2) Génération de virus délétants

Bien que le phénomène d'inhibition des GS par le virus de la varicelle et du zona ait été démontré ci-dessus, la stratégie utilisée par le virus demeure inconnue. Ainsi, l'identification de la/des protéine(s) virale(s) responsable(s) de cette inhibition constitue une étape clé dans l'élucidation de ce mécanisme. À cette fin, la technique de clonage « en passant » a été exploitée de manière à générer 6 souches de VZV KO pour différentes ORFs. Les ORFs étudiées sont les suivantes : ORF1, ORF3, ORF36, ORF58, ORF59 et ORF65. Ces ORFs ont été sélectionnés selon 2 critères : leur caractère non-essentiel à la réPLICATION virale et leur cinétique d'expression précoce au cours du cycle lytique. Pour des raisons de clarté, seuls les résultats pour l'ORF1 vont être présentés dans cette section, mais l'intégralité des données figurent en annexe (**figure S4, S5 et S6**).

a) Introduction d'une mutation ponctuelle via la technique de clonage « en passant »

L'introduction d'un codon de terminaison dans l'ORF1 a été réalisée à l'aide de la technique de clonage « en passant ». Cette méthode exploite la souche GS1783 d'*E. coli* afin d'incorporer une mutation ponctuelle dans un BAC de VZV via un système de double recombinaison. Ce BAC est constitué par un backbone au sein duquel le génome de VZV a été inséré. Ce backbone, délimité par des sites loxP, contient notamment la GFP sous le contrôle d'un promoteur CMV ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol. L'insert comporte le gène de la protéine fluorescente TdTomato, placé sous le contrôle du promoteur SV40 et situé entre l'ORF65 et l'ORF66.

La première étape consistait à générer une cassette de recombinaison contenant la mutation d'intérêt et une cassette d'expression du gène de résistance à la kanamycine (**figure 10a**). Cette cassette a une taille d'environ 1150 pb, ce qui a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (**figure 10b**).

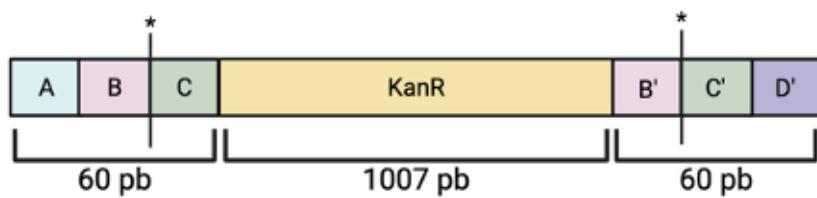
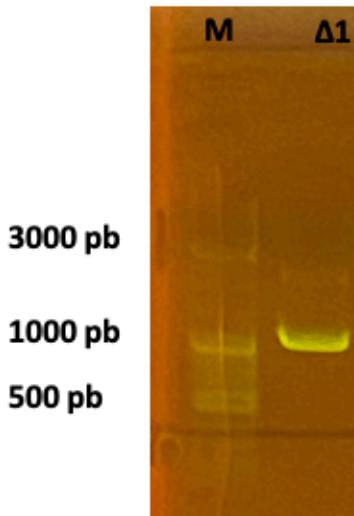
A**B**

Figure 10 : Screening de la cassette PCR $\Delta 1$ par électrophorèse. (A) Dans l'amorce sens, le codon codant est remplacé par le codon de terminaison (représenté par l'étoile *) bordé d'une séquence flanquante de 60 pb divisée en segments de 20 pb, A (bleu), B (rose) et C (vert), la mutation se trouvant entre la section B et C. Elle contient également une séquence de 22 pb homologue au gène de résistance à la kanamycine (KanR, jaune) introduite en aval de la section C. L'amorce anti-sens nécessite d'autres sections de 20 pb : la section D' (violet) qui correspond au complément inversé de la séquence immédiatement en aval de la section C, les sections C' (vert) et B' (rose) qui sont les compléments inversés des sections B et C, avec la mutation comprise entre C' et B' et une séquence de 23 pb correspondant à KanR (jaune). L'amplification par PCR sur base du plasmide modèle pEP_Kan_S2 a permis de générer la cassette contenant une séquence de 1007 pb correspondant à KanR. Image réalisée avec <https://www.biorender.com/> (B) Vérification de la taille de la cassette de recombinaison contenant la mutation d'intérêt et la séquence correspondant au gène de résistance à la kanamycine par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) après amplification par PCR. M correspond au marqueur de poids moléculaire (en pb) et $\Delta 1$ correspond à la cassette contenant la mutation pour ORF1.

La cassette générée ci-dessus a ensuite été introduite par électroporation dans des souches GS1783 d'*E. coli* contenant le BAC de VZV et insérée via une 1^{ère} recombinaison Red. L'incorporation de cette cassette dans les colonies bactériennes, dénommées clones parents, a été vérifiée par PCR sur colonies. Afin de vérifier l'insertion correcte de la cassette, les extrémités 5' et 3' ont été amplifiées avec des amorces spécifiques (**figure 11a**). Une

électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR obtenus a confirmé que les 5 clones parents testés contenaient la cassette d'intérêt (**figure 11b**).

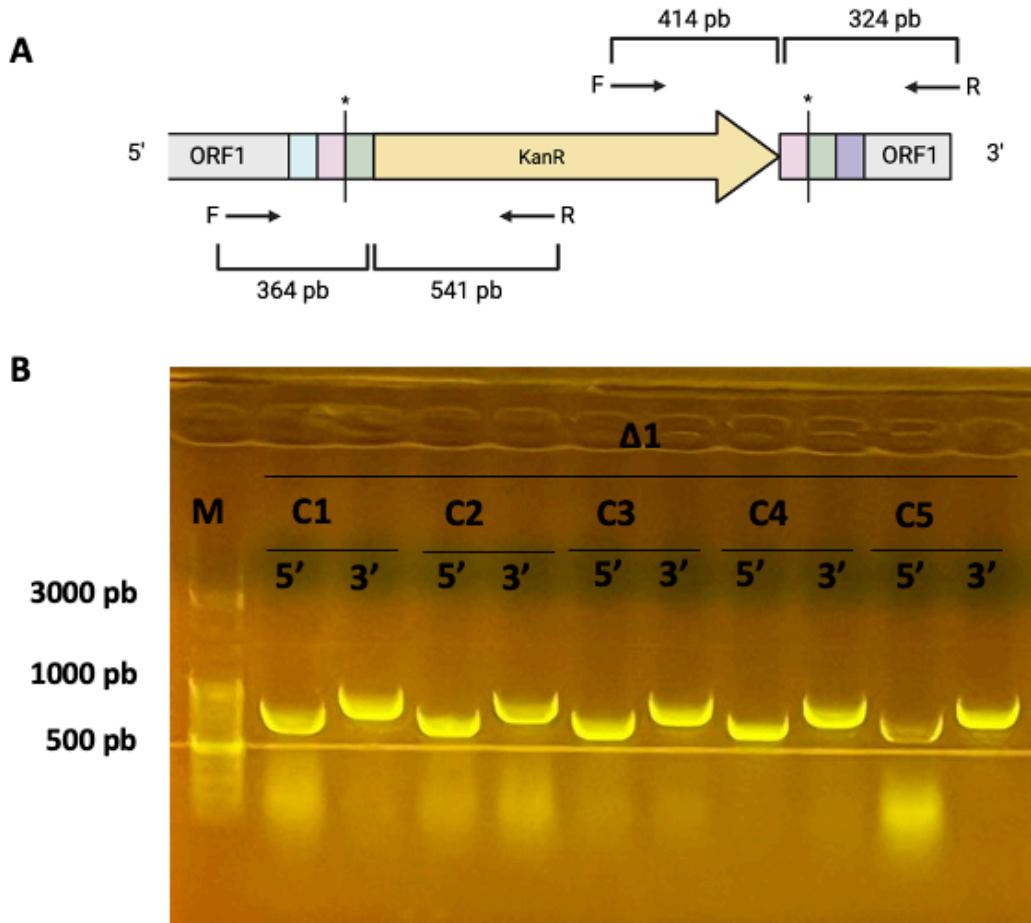


Figure 11 : Screening des clones parents pour $\Delta 1$ par électrophorèse. (A) Amorces utilisées pour l'amplification par PCR de la cassette intégrée dans le BAC de VZV après la 1^{ère} recombinaison Red. Pour chaque amplicon, une amorce cible le gène de résistance à la kanamycine et une autre amorce cible la séquence virale. Image réalisée avec <https://www.biorender.com/> (B) Vérification de la taille de la cassette de recombinaison (incorporée dans les souches GS1783 d'*E. coli* par électroporation) par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) après amplification par PCR. M correspond au marqueur de poids moléculaire (en pb). Les cinq clones présentent une insertion correcte de la cassette kanamycine dans l'ORF1.

Puisqu'un site de restriction de *I-SceI* est présent au sein du gène de résistance KanR, la linéarisation du BAC contenant la mutation d'intérêt a été réalisée via une coupure par l'enzyme de restriction *I-SceI*, dont l'expression est induite par ajout d'arabinose. La linéarisation du BAC va provoquer la seconde recombinaison Red sur base des séquences homologues intégrées par la cassette (B-B' et C-C', **figure 10a**) et permettre d'éliminer le gène KanR. Pour chaque clone parent, 24 clones enfants (indiqués par un #) ont été repiqués en culture liquide sur une plaque contenant du LB-Cm et sur une plaque contenant du LB-Cm-

Kana. Seuls les clones qui ont poussés sur la première plaque mais qui n'ont pas poussés sur la plaque pourvue de kanamycine sont sélectionnés pour la PCR de contrôle avec les amores externes (**figure 12a**). La taille des produits d'amplification a été vérifiée par électrophorèse. Sur les 6 clones enfants testés pour le parent C1, les clones #2, #9, #13, #16 et #24 ont intégré la mutation et ont éliminé le gène de résistance à la kanamycine. En revanche, le clone #5 semble avoir conservé la séquence puisque l'amplicon a une taille supérieure à 1150 pb. De plus, tous les clones enfants ont été validés pour le parent C2 (**figure 12b**).

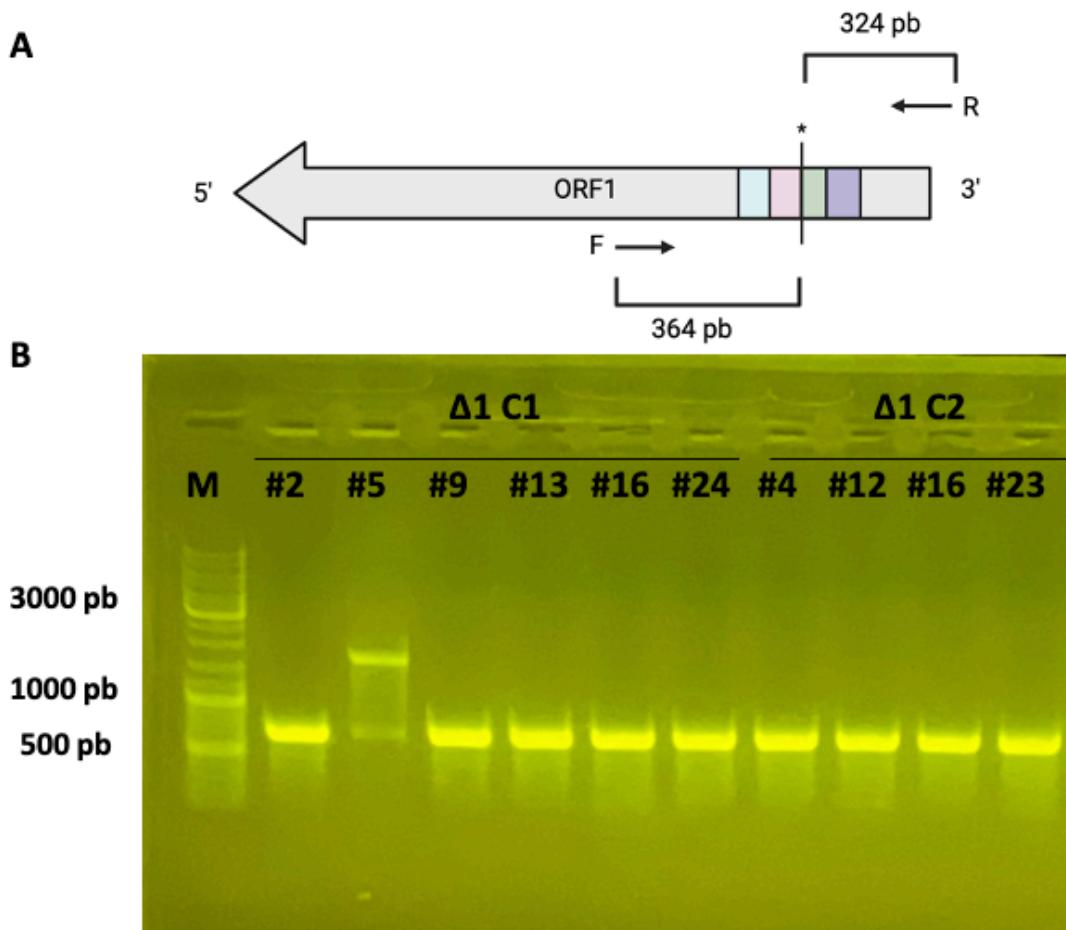


Figure 12 : Screening par PCR de la deuxième étape de recombinaison pour $\Delta 1$. (A) Amores utilisées pour l'amplification par PCR de la mutation intégrée dans le BAC de VZV après la 2^{ème} recombinaison Red. Image réalisée avec <https://www.biorender.com/> (B) PCR sur colonie de clones qui ont perdu la capacité de croître en présence de kanamycine. La taille des produits d'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). M correspond au marqueur de poids moléculaire (en pb). Tous les clones enfants présentent une insertion correcte de la mutation dans l'ORF1, à l'exception de l'enfant #5 du parent C1.

b) Vérification de la mutation introduite dans le BAC de VZV

Une fois que les clones enfants comportant la mutation d'intérêt ont été identifiés, une vérification de la mutation incorporée a été nécessaire via un séquençage de Sanger. Le BAC VZV Δ 1 a ensuite été amplifié et purifié à l'aide d'une maxi-préparation sur un gradient de chlorure de césum, avant d'être transfecté dans des Mewo-Cre. Ces cellules ont été passées 2 à 4 fois jusqu'à l'obtention de foyers dépourvus de la GFP, signe que le backbone a été excisé. Ensuite, ces Mewo-Cre ont été utilisées afin d'infecter les ARPE-19 par co-culture. Ces dernières ont été passées 2 à 3 fois afin d'éliminer les Mewo-Cre de l'inoculum, puis l'ADN génomique a pu être extrait. Ainsi, un séquençage avec les amorces bordant les ORFs mutées (**figure 12a**) a été effectué sur l'ADN génomique extrait de ces cellules afin de vérifier l'intégrité de la mutation introduite. En effet, il était nécessaire de vérifier que la mutation n'ait pas réverté lors des différents passages en culture cellulaire.

Après avoir décrit en détails les résultats liés à l'introduction de la mutation ponctuelle dans l'ORF1 de VZV, l'ensemble des virus délétants générés seront désormais présentés. Bien que des contrôles ont été réalisés afin de confirmer l'introduction de la mutation ponctuelle dans la séquence qui code ORF1, ORF3, ORF36, ORF58, ORF59 et ORF65, il était nécessaire de vérifier l'absence d'expression de ces protéines. Néanmoins, pour l'ORF36, l'ORF59 et l'ORF65, cela a été impossible car les anticorps détectant ces protéines ne sont pas commercialisés. Des extraits protéiques ont été obtenus en lysant les ARPE-19 infectées par VZV KO puis analysés par un Western-blot. Un anticorps dirigé contre la β -tubuline a été utilisé comme contrôle de charge et un anticorps anti-IE62 comme contrôle du niveau d'infection. Ensuite, il a été observé que les protéines encodées par ORF1, ORF3 et ORF58 sont exprimées dans les échantillons infectés par la souche VZV WT mais non exprimées dans les souches correspondantes de VZV KO (**figure 13**).

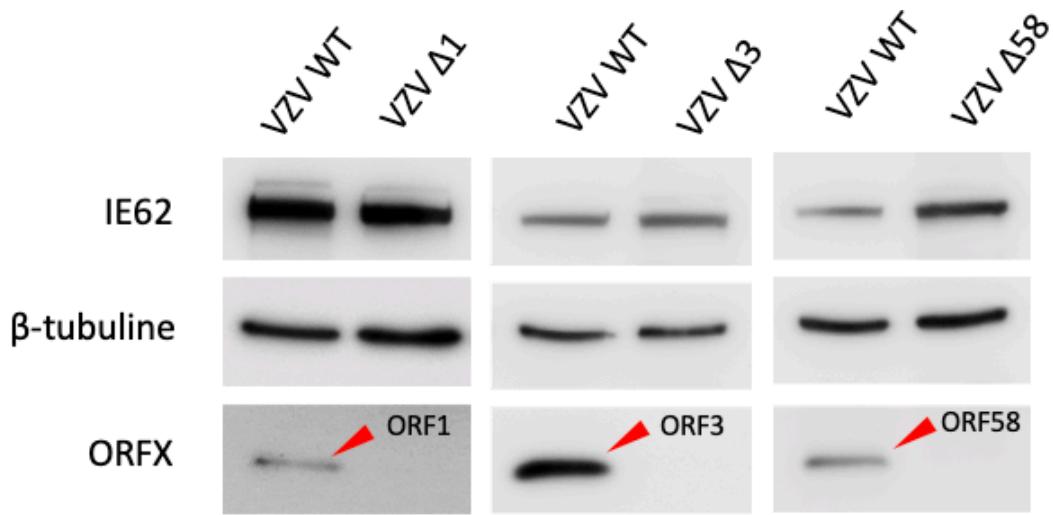


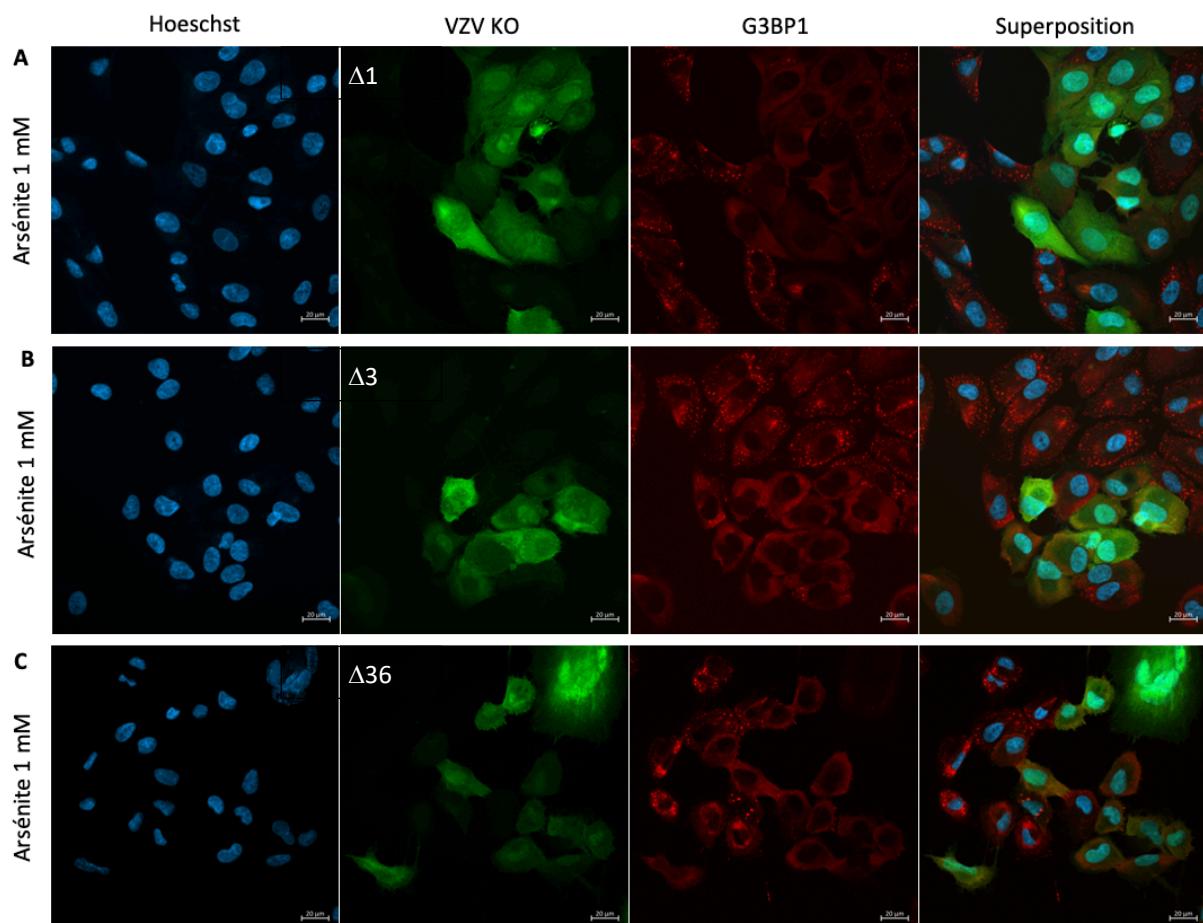
Figure 13 : Vérification de l'absence d'expression des protéines mutées par Western-Blot. Des ARPE-19 ont été infectées par les différentes souches WT et KO de VZV puis les protéines ont été extraites et chargées sur un gel d'électrophorèse. Les protéines virales (ORF1, ORF3 et ORF58) ont été mises en évidence grâce à leurs anticorps correspondants. La protéine IE62 a été utilisée comme contrôle de l'infection, alors que la protéine cellulaire β -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. Les flèches rouges indiquent le signal des protéines correspondantes.

3) Phénotypage des virus délétants

Les 6 souches de VZV KO générées au cours de ce mémoire ($\Delta 1$, $\Delta 3$, $\Delta 36$, $\Delta 58$, $\Delta 59$ et $\Delta 65$) ont été ciblées via des expériences d'immunofluorescence. Le but de ces analyses est d'évaluer si la suppression de l'expression d'une protéine donnée compromet le phénomène d'inhibition des GS par le virus. Dans ces conditions, c'est la kinase HRI qui a été activée puisqu'un stress a été induit par un traitement à l'arsénite 1 mM pendant 30 min à 37°C. La visualisation des granules de stress a été permise grâce à un immunomarquage de G3BP1, qui est la protéine nucléatrice principale de ces biocondensats moléculaires. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de cellules positives aux GS.

Premièrement, très peu de granules de stress se forment dans les cellules en l'absence d'un traitement, mis à part quelques GS spontanées qui apparaissent dans les cellules infectées (**flèche jaune, figure S7**). Concernant, l'apparition spontanée des GS, aucune différence notable n'a été identifiée entre la souche VZV WT (**figure 9b**) et les différentes souches VZV KO étudiées lorsque l'infection est réalisée par co-culture (**figure 14g**). Deuxièmement, seules les cellules NI présentent un taux important de cellules positives aux

GS (entre 91 et 99%) lorsqu'un traitement à l'arsénite est appliqué (**figure 14a-f**). Tout comme la souche VZV WT, le nombre de cellules infectées avec des granules de stress n'est que très faible, par exemple il est compris entre 1 et 4% pour la souche VZV $\Delta 1$ (**figure 14g**). Toutefois, l'infection par la souche VZV $\Delta 36$ s'est démarquée des autres infections. En effet, au terme des comptages réalisés pour les 3 répliquats, le pourcentage de cellules positives aux GS était de 1, 15 et 3% pour les cellules infectées. Pour déterminer si la protéine encodée par l'ORF36 était potentiellement impliquée dans le phénomène d'inhibition, un 4^{ème} répliquat a été effectué, révélant que 2% des cellules infectées possédaient des GS. Même si ces résultats sont intrigants, ils suggèrent que la protéine encodée par l'ORF36 n'est pas directement impliquée dans l'inhibition des GS par VZV. Troisièmement, les cellules non infectées entourant les cellules infectées (I-) présentent un taux de cellules positives aux GS qui est inférieur aux cellules NI (**figure S8**), comme c'était le cas avec l'infection WT (**figure S3**).



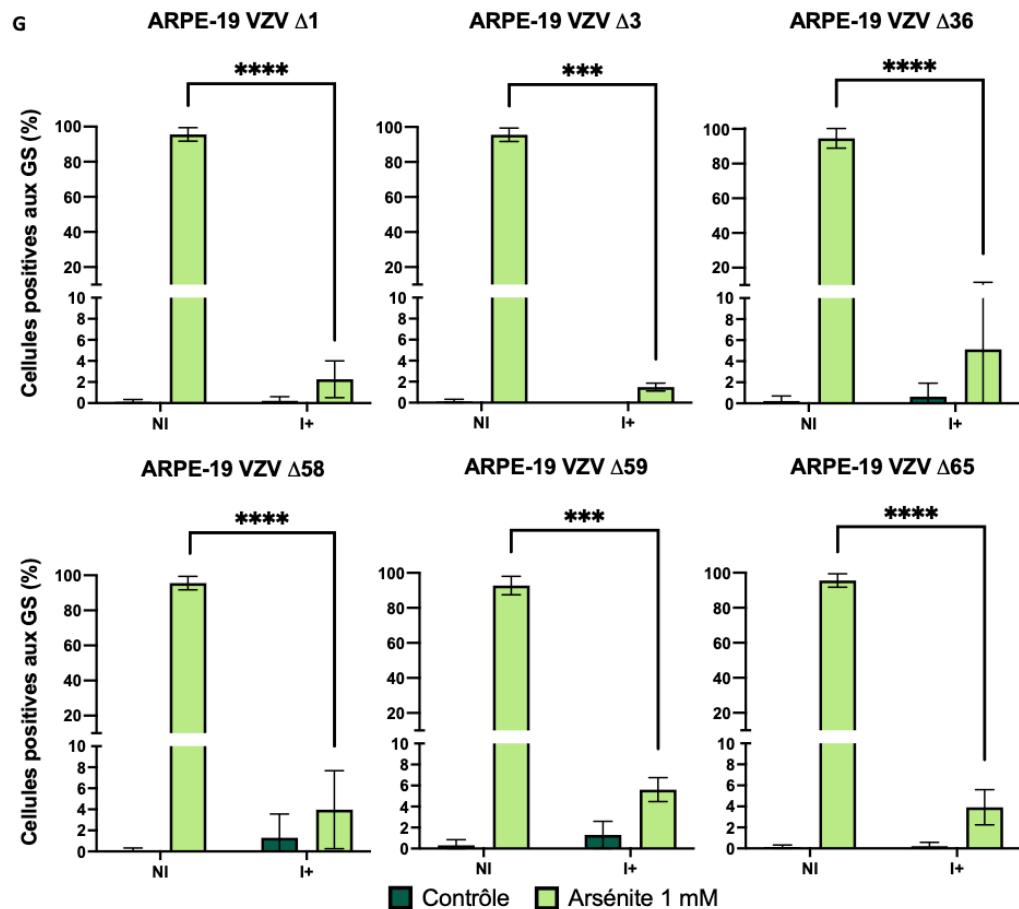
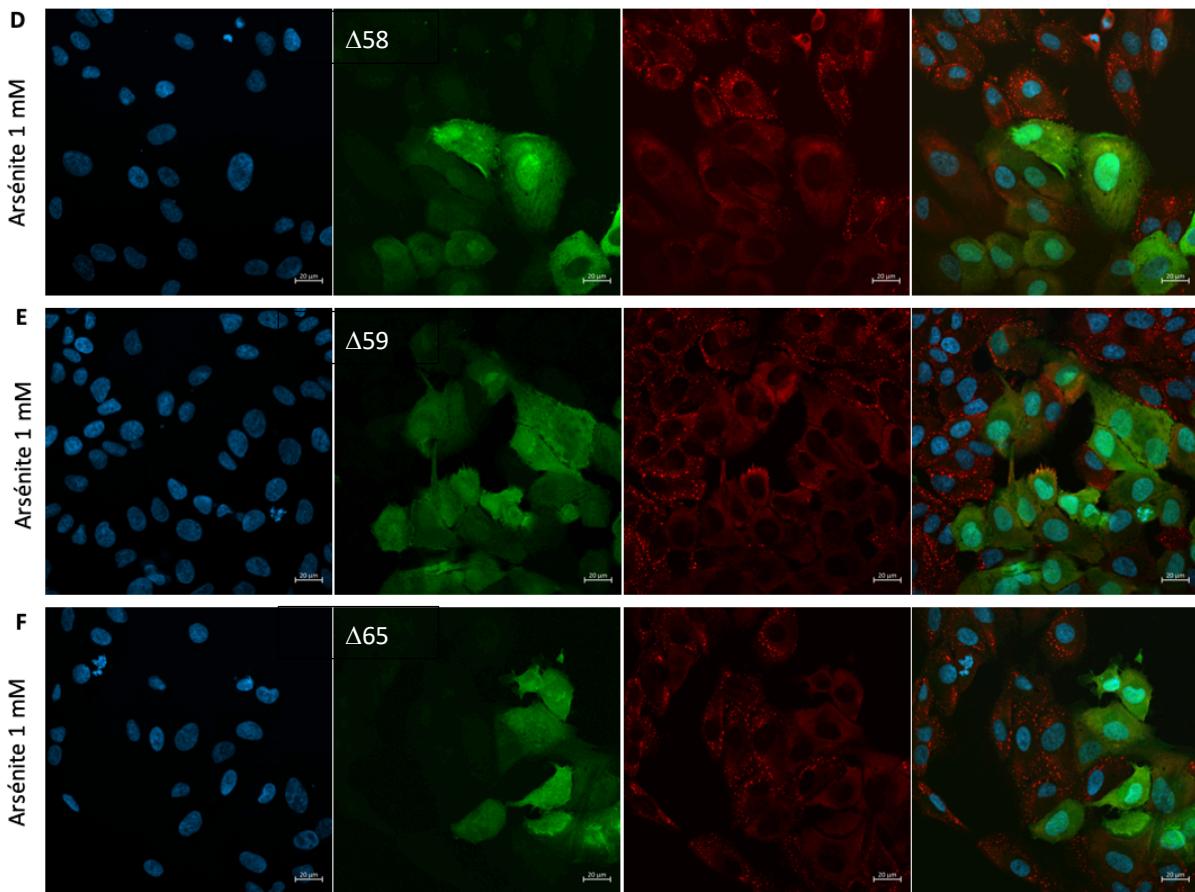


Figure 14 : Inhibition des granules de stress par VZV Δ1, Δ3, Δ36, Δ58, Δ59 et Δ65. Immunofluorescence anti-G3BP1 (représenté en rouge) de ARPE-19 infectées par VZV **(A)** Δ1, **(B)** Δ3, **(C)** Δ36, **(D)** Δ58, **(E)** Δ59, **(F)** Δ65 et traitées à l'arsénite de sodium (1 mM pendant 30 min). Les noyaux sont marqués au Hoeschst (représenté en bleu) et les souches de VZV KO expriment la protéine fluorescente Td-Tomato (représentée en vert). Pour chaque condition, un z-stack a été réalisé, avec des acquisitions d'images tous les 50 µm. **(G)** Pourcentage de cellules positives aux GS dans les cellules non infectées (issues d'une lame dépourvue d'infection, NI) et infectées par VZV KO (I+), dans des conditions de contrôle (en vert foncé) ou de traitement (en vert clair). Au total, 150 cellules I+ ont été comptées et les cellules sont considérées comme positives aux GS lorsqu'elles en possèdent au moins 5. L'expérience a été réalisée 3 fois (sauf pour Δ36 où l'expérience a été réalisée 4 fois) et un t-test non pairé a été effectué (**p=0,0002, ****p<0,0001).

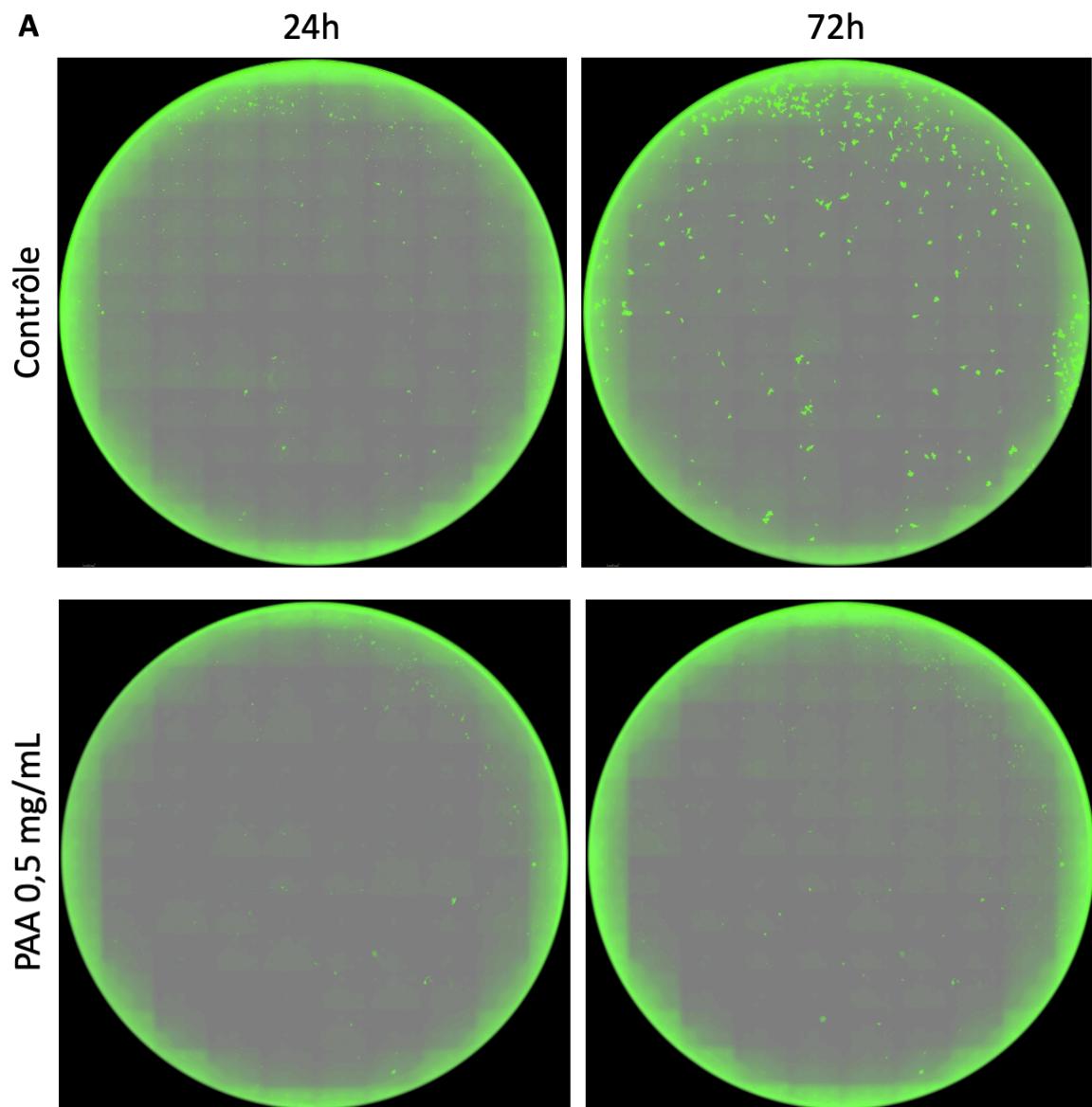
4) La cinétique d'inhibition des GS par VZV

De manière à identifier précisément le moment de l'infection où le virus de la varicelle et du zona est responsable de l'inhibition des GS, une cinétique a été réalisée. Cette expérience permet également de déterminer la période du cycle infectieux au cours de laquelle les GS spontanées apparaissent. Dans un premier temps, l'effet du PAA sur la croissance du virus a été déterminé par l'Incucyte. Dans un second temps, un immunomarquage de G3BP1 a permis de suivre l'évolution de l'inhibition des GS par le virus et d'imager le phénomène. Pour ce faire, des ARPE-19 ont été infectées par des particules libres produites à partir d'une souche de VZV WT exprimant la GFP. Pour réaliser l'infection, les particules libres ont été placées au contact des cellules pendant 45 min après une centrifugation de 15 min à 1000g. Ensuite, le milieu des cellules a été remplacé par du milieu frais ou par du milieu contenant du PAA à une concentration de 0,5 ou 1 mg/mL.

a) Croissance virale

À la suite de l'infection des cellules et du remplacement du milieu par du milieu frais ou du milieu contenant le PAA, la plaque a été scannée à l'Incucyte toutes les 2h au cours des 24 premières heures d'infection, puis une image a été prise à 48h et à 72h post-infection. Étant donné que le PAA est un composé antiviral connu pour interférer avec l'ADN polymérase des Herpèsvirus, son effet a été vérifié sur la croissance de VZV. Dans ces conditions, la surface totale des puits occupée par de la fluorescence verte a été évaluée à l'aide du logiciel d'analyse de l'Incucyte puisque le virus exprime la GFP. Lors des 24 premières heures d'infection, la

croissance du virus est stable et relativement faible. Cependant, après 48h et 72h d'infection, une nette augmentation est observée (passant de 2 millions à 7 millions puis 13 millions de $\mu\text{m}^2/\text{puits}$), démontrant ainsi la capacité du virus à se répliquer en l'absence de PAA (**figure 15b**). En effet, il est observé que le nombre et la taille des foyers d'infection augmentent au cours du temps (**figure 15a**). En revanche, lorsqu'un traitement au PAA est appliqué, la surface totale occupée par les objets verts n'augmente pas, et ce, quelle que soit la concentration utilisée (**figure 15a et b**). Ces résultats permettent de vérifier que l'acide phosphonoacétique interfère avec le processus de réplication de VZV, impactant grandement la croissance du virus. En outre, aucune différence notable sur la croissance du virus n'ayant été observé entre les deux concentrations en PAA, les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées à une concentration de 0,5 mg/mL uniquement.



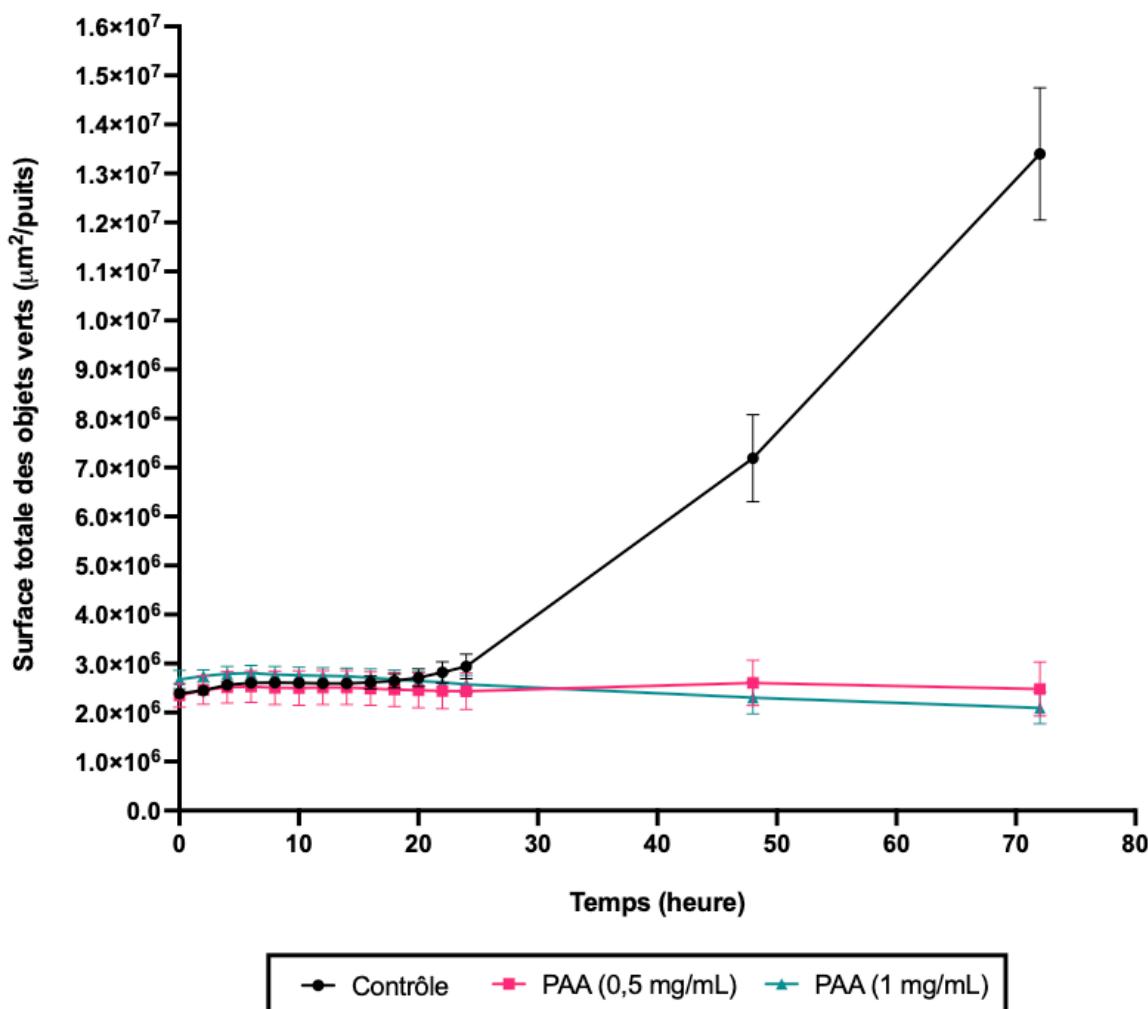
B**Influence du PAA sur la croissance de VZV**

Figure 15 : Influence de l'acide phosphonoacétique sur la croissance de VZV. (A) Les ARPE-19 ont été infectées par des particules libres fraîchement produites à partir de la souche VZV WT-GFP. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu frais (contrôle) ou par du milieu contenant du PAA (0,5 mg/mL). (B) La croissance du virus a été évaluée par le logiciel d'analyse de l'Incucyte en déterminant la surface occupée par la fluorescence verte (en $\mu\text{m}^2/\text{puits}$) exprimée par VZV WT-GFP. L'analyse a été réalisée dans les conditions de contrôle (en noir) et en présence de PAA (0,5 mg/mL en rose, ou 1 mg/mL en bleu). Résultats issus d'une expérience unique, chaque point correspond à la moyenne \pm écart-type de dupliques.

b) Immunofluorescence

Les expériences d'immunofluorescence réalisées après avoir infecté des ARPE-19 à l'aide de particules libres de VZV se sont déroulées en réalisant un traitement au PAA (0,5 mg/mL) dans la moitié des conditions. Sachant que le PAA interfère avec la réplication de l'ADN viral, aucun effet ne devrait être rapporté avant 8h d'infection, qui est le moment où l'expression

des gènes L démarre. Ensuite, la localisation de la protéine G3BP1 a été visualisée par immunofluorescence en absence d'un traitement à l'arsénite (pour visualiser les GS spontanées) et en présence d'arsénite. Les cellules infectées ont été identifiées grâce à un anticorps dirigé contre la protéine IE63 de VZV, mais également grâce à la présence de la GFP exprimée par cette souche WT. Sur chaque lame, les cellules infectées (I+, càd exprimant la GFP et IE63) et non infectées (I-, càd n'exprimant ni la GFP, ni IE63) ont été comptées.

Dans un premier temps, le milieu des cellules infectées a été remplacé par du milieu frais dépourvu de PAA et aucun traitement à l'arsénite n'a été effectué. Ces conditions permettent donc d'identifier la cinétique d'apparition des GS spontanées. Ainsi, le pourcentage de cellules non infectées (I-) positives aux GS est assez faible et ne varie quasiment pas au cours du temps (**figure 16a**). En revanche, et ce de façon surprenante, le taux de cellules infectées avec des GS spontanées est très important. En effet, à 4h post-infection ce pourcentage est de 13% puis oscille entre 40 et 55% aux heures suivantes (**figure 16a**). En parallèle, un traitement à l'arsénite a été réalisé pour observer la cinétique d'inhibition des GS déclenchées par ce stress. Dans ce cas, l'arsénite initie un stress important pour les cellules non infectées (I-) puisque 70 à 85% des cellules sont positives aux GS. Toutefois, le taux de cellules infectées présentant des GS est inférieur à 10%, à l'exception de 8h post-infection où il est à 18% (**figure 16b**). Ainsi, ces données mettent en évidence que le taux de formation des GS dans les cellules infectées en présence d'arsénite (**figure 16b**) est largement inférieur au taux d'apparition des GS spontanées (**figure 16a**). En effet, si on compare les résultats en présence et en absence d'arsénite, à 4h post-infection, la différence entre les 2 conditions n'est que très faible, tandis qu'à partir de 6h post-infection, la différence est fortement marquée. Ces données surprenantes suggèrent que VZV induirait fortement les GS spontanées lorsque l'infection est réalisée avec des particules libres et que le traitement à l'arsénite activerait une voie de désassemblage médiée par une ou des protéine(s) virale(s). De plus, la protéine responsable de l'inhibition semble être exprimée dès 6h post-infection.

Dans un second temps, le milieu des cellules infectées a été remplacé par du milieu contenant du PAA à 0,5 mg/mL. Cette condition permet d'étudier l'influence du PAA sur les GS spontanées. Ainsi, l'ajout de PAA augmente systématiquement le pourcentage de cellules non infectées (I-) positives aux GS (**figure 17a, hachuré**). Même si cette augmentation est

relativement modérée, cela démontre tout de même que l'ajout de PAA initie un léger stress pour les cellules. Sur les cellules infectées, mis à part au temps 6h, le PAA ne semble pas avoir d'effet majeur sur les GS spontanées. En effet, à partir de 8h post-infection, le pourcentage de cellules positives aux GS atteint la même valeur que lorsque le PAA était absent (**figure 17a**). Ces données permettent de démontrer que le PAA n'a pas d'effet drastique sur l'apparition des GS spontanées. En parallèle, un traitement à l'arsénite a été réalisé sur des cellules traitées avec 0,5 mg/mL de PAA. Dans ce cas, le PAA ne semble pas avoir d'effet majeur sur le taux de GS des cellules non infectées (I-) (**figure 17b**). Sur les cellules infectées, le PAA a des effets difficilement interprétables sur le pourcentage de cellules infectées positives aux GS aux temps précoces d'infection (4, 6 et 8h). En revanche, à des temps supérieurs, ce pourcentage augmente par rapport à l'absence de PAA (**figure 17b**). Cela suggère qu'une protéine, dont l'expression est réduite par la présence de PAA, pourrait contribuer au phénomène d'inhibition.

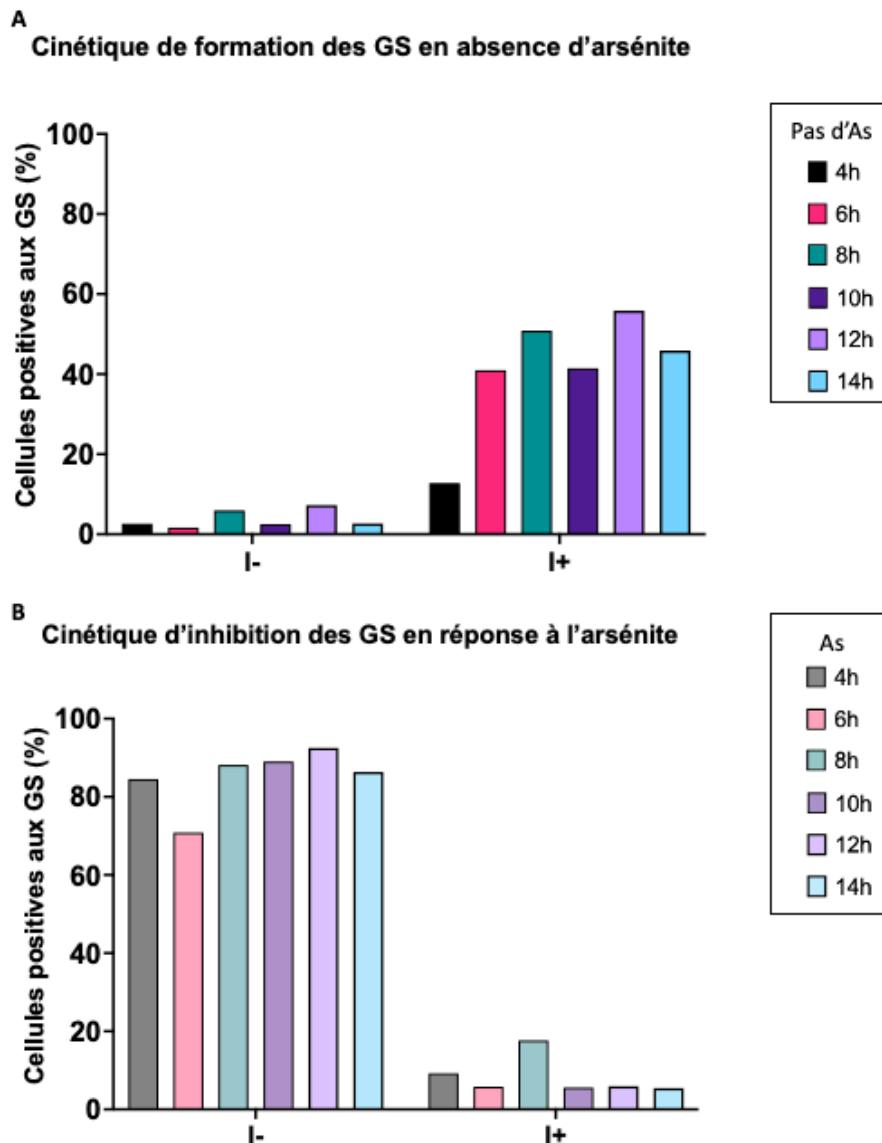


Figure 16 : Cinétique de formation des granules de stress. Les ARPE-19 ont été infectées par des particules libres fraîchement produites à partir de la souche VZV WT-GFP. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu frais (**A**) sans traitement à l'arsénite (couleurs vives) ou (**B**) avec un traitement à l'arsénite (30 min, 1mM, couleurs pâles) à 4h (noir), 6h (rose), 8h (vert), 10h (violet foncé), 12h (violet clair) et 14h (bleu clair) post-infection. Le nombre maximal de cellules infectées présentes sur la lame a été compté et le pourcentage de cellules positives aux GS dans les cellules non infectées (I-) et infectées (I+) a été déterminé. Les cellules sont considérées comme positives aux GS lorsqu'elles en possèdent au moins 5. Les résultats sont issus d'une expérience unique.

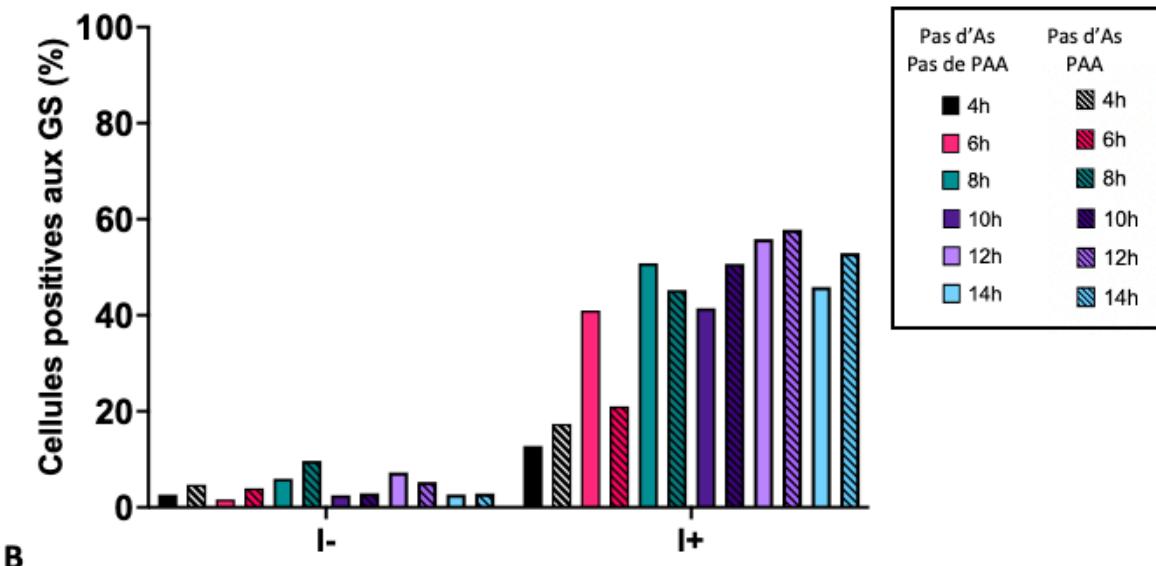
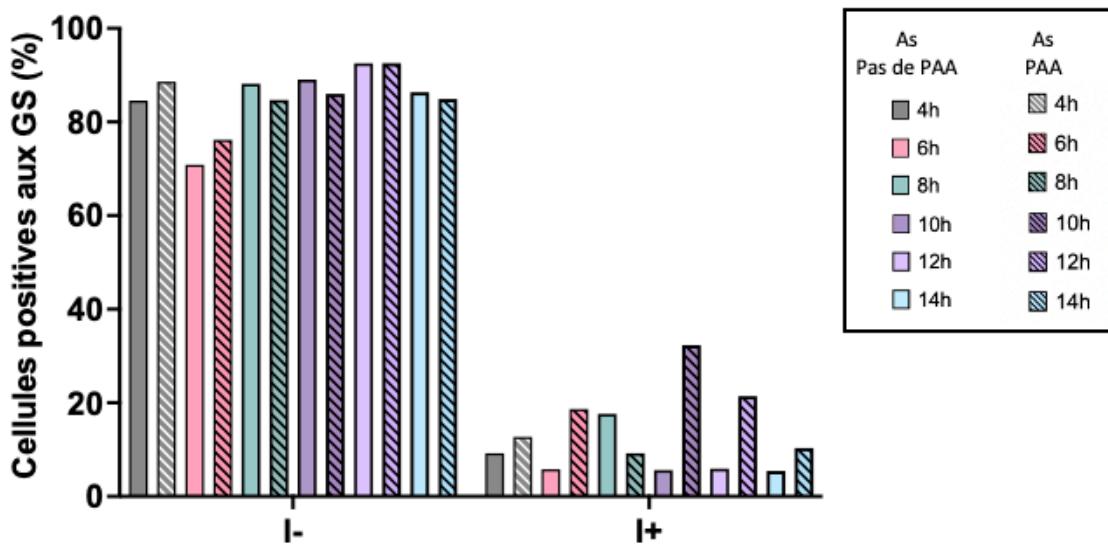
A**Influence du PAA sur les GS spontanées****B****Influence du PAA sur les GS formées en présence d'arsénite**

Figure 17 : Influence de l'acide phosphonoacétique sur la cinétique d'inhibition des GS. Les ARPE-19 ont été infectées par des particules libres fraîchement produites à partir de la souche VZV WT-GFP. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu frais (pas de PAA, non hachuré) ou par du milieu contenant du PAA (0,5 mg/mL hachuré) (**A**) sans traitement à l'arsénite (couleurs vives) ou (**B**) avec un traitement à l'arsénite (30 min, 1mM, couleurs pâles) à 4h (noir), 6h (rose), 8h (vert), 10h (violet foncé), 12h (violet clair) et 14h (bleu clair) post-infection. Le nombre maximal de cellules infectées présentes sur la lame a été compté et le pourcentage de cellules positives aux GS dans les cellules non infectées (I-) et infectées (I+) a été déterminé. Les cellules sont considérées comme positives aux GS lorsqu'elles en possèdent au moins 5. Les résultats sont issus d'une expérience unique.

DISCUSSION

1) Inhibition des granules de stress par le virus de la varicelle et du zona

Actuellement, aucun article démontrant la capacité du virus de la varicelle et du zona à inhiber la formation des granules de stress n'a été publié. Or, des données précédemment obtenues au sein du laboratoire permettent d'affirmer la capacité du virus à contourner la réponse immunitaire innée en empêchant la formation de ces granules. Pour soutenir ces propos, un immunomarquage de G3BP1, qui est la principale protéine nucléatrice des GS, a été effectué à la suite d'un traitement à l'arsénite sur des ARPE-19 infectées, ou non, par la souche WT du virus. Il ressort de cette analyse que le pourcentage de cellules positives aux GS est de quasiment 100% dans les cellules NI, alors qu'il est inférieur à 5% lorsque les cellules sont infectées (**figure 9b**). Ces données permettent de démontrer la capacité de VZV à inhiber la formation des GS dans le contexte d'une stimulation à l'arsénite sur des cellules infectées par co-culture.

La stratégie utilisée par VZV afin d'inhiber les granules de stress est, pour l'instant, totalement inconnue. En général, les virus sont capables d'interférer avec la formation des GS via trois voies : (1) en empêchant la phosphorylation d'elF2 α , (2) en déphosphorylant elF2 α grâce à la phosphatase PP1, ou (3) en interagissant avec les composants des GS [76]. Souvent, la capacité des virus à inhiber ce processus ne se limite pas à une seule voie. Dans la littérature, il a été décrit que des membres de la sous-famille des alphaherpèsvirus sont capables d'interférer avec la formation des GS. Par exemple, HSV-1 interfère avec la formation des GS selon différents processus. Tout d'abord, la protéine Vhs (*Viral Host Shutoff protein*) encodée par le gène UL41 empêcherait l'activation de PKR grâce à son activité d'endoribonucléase. En se liant aux facteurs d'initiation de la traduction elF4H et elF4F, cette protéine induit des coupures dans les ARNm cellulaires en cours de traduction, de manière à empêcher leur condensation dans les GS, tout en diminuant la disponibilité en ARN, ce qui réduit l'activation de la kinase PKR [77][78]. De plus, l'activité de cette kinase est également impactée négativement par la protéine Us11 qui se lie à l'ARNdb. En outre, la kinase PERK est aussi bloquée par gB qui empêche la détection d'un stress dans le RE en se liant à la kinase [78]. Ensuite, même si les kinases sont activées, la protéine ICP34.5 a pour fonction de recruter la

phosphatase PP1, qui initie la déphosphorylation d'elF2 α . Ainsi, le virus exerce un contrôle continu tout au long de l'infection, puisque la protéine Vhs est immédiatement exprimée au cours du cycle lytique, alors qu'ICP34.5 est exprimée rapidement après la synthèse d'ADN viral, et que gB et Us11 sont exprimées plus tardivement [78]. Par ailleurs, tous les alphaherpèsvirus contiendraient un homologue de Vhs. Chez VZV, l'homologue de Vhs serait encodé par l'ORF17 puisqu'il présente une identité de séquence de 39% avec Vhs [79]. Cependant, aucune activité d'endoribonucléase n'a été associée à la protéine encodée par l'ORF17 chez VZV, suggérant que cette protéine n'agirait pas de la même manière que Vhs [80]. Enfin, un autre mécanisme utilisé par le PRV (PseudoRabies Virus) est que la protéine virale IE180 séquestre les protéines G3BP dans le noyau afin d'empêcher la formation des GS. Les auteurs suggèrent d'ailleurs que ce mécanisme pourrait être conservé chez tous les alphaherpèsvirus puisque des protéines IE de HSV-1 (ICP0 et ICP4) colocalisent dans le noyau avec G3BP1 [81]. Toutefois, si ce mécanisme était présent chez VZV, un immunomarquage de G3BP1 aurait été observé dans le noyau des cellules infectées, ce qui n'est pas le cas.

Un autre élément intéressant identifié au cours de ce mémoire est que les cellules infectées par VZV semblent avoir une influence sur les cellules non infectées environnantes. En effet, lorsque les cellules sont traitées à l'arsénite, le taux de cellules positives aux GS est systématiquement plus bas dans les cellules non infectées qui entourent les cellules infectées (I-) que dans les cellules issues d'une lame dépourvue d'infection (NI)(**figure S3**). Ces données suggèrent que le virus pourrait libérer des facteurs solubles ou des signaux qui entraînent une inhibition des GS dans les cellules non infectées environnantes. Afin de le vérifier, il pourrait être intéressant de compter le taux de cellules non infectées positives aux GS après exposition de ces cellules à un milieu conditionné issu de cellules infectées. Par ailleurs, dans les expériences décrites précédemment, c'est l'expression de la protéine fluorescence Td-Tomato qui a permis de définir si une cellule était infectée ou non. Il se pourrait donc que certaines cellules considérées I- soient en réalité à un stade précoce de l'infection. L'immunomarquage de protéines virales exprimées plus tôt durant le cycle viral, telles que IE61 ou IE4, permettrait de comptabiliser plus facilement ces cellules.

2) Génération de virus délétants

Le paragraphe précédent démontre la diversité utilisée par les alphaherpèsvirus pour inhiber la formation des GS. Néanmoins, les mécanismes utilisés par VZV sont encore totalement inconnus, même si des données préliminaires issues du laboratoire d'accueil et non publiées proposent que l'inhibition aurait lieu en aval de la phosphorylation de eIF2 α . Ainsi, l'identification de la/les protéine(s) responsable(s) du phénomène est cruciale afin de décoder le processus à l'origine de l'évasion immunitaire de VZV. Le laboratoire a donc comme objectif de réaliser une librairie visant à étudier les 71 ORFs du virus via une approche « perte de fonction ». La stratégie utilisée pour réaliser cette librairie est d'étudier les différentes protéines selon leur ordre d'expression au cours du cycle lytique. C'est dans ce contexte que 6 ORFs (ORF1, ORF3, ORF36, ORF58, ORF59 et ORF65) ont été sélectionnées sur base de 2 critères : leur caractère non essentiel à la réPLICATION virale, permettant de conserver ces souches de VZV KO en culture, mais également leur cinétique d'expression *True-Early*, à l'exception d'ORF3 qui est une *Early-Late*. L'approche choisie pour générer ces souches de VZV KO était d'introduire une mutation ponctuelle en modifiant un codon codant par un codon de terminaison. Le choix d'introduire un codon STOP plutôt que de déléter l'entièreté de l'ORF se justifie par la volonté de ne pas affecter l'expression des transcrits. Un des critères établis pour générer la mutation était de l'introduire au plus proche du codon START. En revanche, si une méthionine était repérée dans les 30 premiers AA de la séquence de l'ORF, le codon STOP était introduit en aval de cette méthionine pour éviter qu'elle ne serve de site alternatif d'initiation de la traduction. Néanmoins, l'inconvénient de cette méthode est que la mutation peut réverter, c'est-à-dire que le virus peut restaurer son phénotype initial grâce à l'apparition d'une autre mutation.

Afin de générer les 6 souches de VZV KO, la méthode dénommée clonage « en passant » a été exploitée de manière à introduire une mutation ponctuelle dans les 6 ORFs. Chaque étape du protocole a nécessité de réaliser des contrôles, principalement par PCR et électrophorèse sur gel d'agarose. En effet, il fallait tout d'abord vérifier la taille de la cassette générée (**figure 10**), avant de l'électroporer dans la souche GS1783 d'*E. coli*. Après la première recombinaison Red, la vérification de l'incorporation de la cassette dans le BAC était nécessaire (**figure 11**) avant d'initier la 2^{ème} recombinaison et vérifier la disparition du gène de résistance à la

kanamycine (**figure 12**). Ensuite, les séquences correspondantes aux différents ORFs mutés introduits dans les BAC ont été séquencées afin de contrôler la mutation introduite, puis les BAC ont été amplifiés par une maxi-préparation et transfectés dans des Mewo-Cre. Le passage de l'infection en présence de la recombinase Cre a assuré l'élimination du backbone du BAC, contenant notamment la cassette d'expression de la GFP. Enfin, l'infection a été transférée sur des ARPE-19 et le taux d'infection a été suivi grâce à la Td-Tomato exprimée par le virus. Enfin, deux derniers contrôles ont été effectués : le premier a été de séquencer l'ADN génomique des cellules infectées par les souches de VZV KO afin de vérifier que la mutation était toujours présente après plusieurs passages en culture. Le second a été de confirmer l'absence d'expression des différentes protéines par Western-blot (**figure 13**). Ce Western-blot a permis de mettre en évidence que les protéines encodées par l'ORF1, l'ORF3 et l'ORF58 ne sont effectivement pas exprimées dans les souches KO correspondantes par rapport à la souche VZV WT. Malheureusement, la vérification n'a pas pu être effectuée pour les souches Δ36, Δ59 et Δ65 puisque les anticorps correspondants ne sont pas commercialisés.

3) Phénotypage des virus délétants

À l'issu du clonage, le phénotypage des différentes souches de VZV KO visait à déterminer si l'absence de ces protéines impactait, ou non, le phénomène d'inhibition des granules de stress par le virus. En ce sens, les cellules ont été stressées par un traitement à l'arsénite, puis visualisées au microscope confocal par immunomarquage de G3BP1. Il s'avère que le pourcentage de cellules positives aux GS est de quasiment 100% dans les cellules NI, alors qu'il est inférieur à 10% dans les cellules infectées (**figure 14b**). Ces résultats indiquent que les protéines encodées par l'ORF1, l'ORF3, l'ORF36, l'ORF58, l'ORF59 et l'ORF65 ne sont pas essentielles dans le processus d'inhibition des GS par VZV. Toutefois, les comptages effectués pour les cellules infectées par VZV Δ36 ont été surprenants car, au terme des 3 réplicats, les pourcentages de cellules positives aux GS étaient de 1, 15 et 3% pour les cellules infectées. En conséquence, un 4^{ème} réplicat a été effectué, révélant que 2% des cellules infectées possédaient des GS. Ainsi, 3 réplicats présentent un pourcentage très proche, confirmant que la protéine encodée par l'ORF36 n'interviendrait pas dans le processus d'inhibition. Néanmoins, il pourrait être intéressant d'étudier cette protéine selon une approche de gain de fonction pour s'assurer que, seule, elle n'est pas capable d'inhiber les GS. De plus, il a

également été remarqué que le pourcentage de cellules positives aux GS dans les cellules I- était inférieur à celui des NI (**figure S8**). Ce pourcentage dans les conditions d'infection avec les différents délétants (**figure S8**) est similaire à celui observé avec le virus sauvage (**figure S3**) ce qui suggère que les protéines encodées par ces ORFs ne sont pas impliquées dans le phénomène d'inhibition qui pourrait provenir d'un facteur soluble.

Avec un peu de recul, le fait que les 6 ORFs étudiés ne soient pas impliqués dans le processus d'inhibition n'est peut-être pas si surprenant. Tout d'abord, les protéines homologues chez HSV-1 n'ont aucun rôle connu dans l'inhibition des GS. Notons que ORF1 n'a pas de forme homologue chez HSV-1 puisqu'il s'agit d'un des 5 gènes uniques de VZV [82]. Cette protéine est considérée comme une protéine TA (Tail-Anchored) puisque son domaine C-terminal hydrophobe s'ancre dans la membrane en l'absence d'un signal de translocation N-terminal. Sa fonction est encore inconnue mais, au vu de sa localisation dans la membrane plasmique et la région périnucléaire, elle pourrait être impliquée dans la maturation des virions, le transport vésiculaire ou l'adhésion cellule-cellule [83]. Concernant ORF3, sa fonction est encore inconnue, tout comme la fonction de son homologue chez HSV-1 (UL55) qui est également dispensable pour la réPLICATION virale [84]. L'ORF36, quant à elle, est une thymidylate kinase (TK), c'est-à-dire qu'elle induit la phosphorylation de thymidine monophosphate (TMP) en thymidine triphosphate (TTP), ce qui est nécessaire pour la synthèse de l'ADN [85]. Cette protéine est essentielle pour l'action de composés antiviraux, tels que l'acyclovir, puisque cet analogue de nucléoside est phosphorylé par la TK et incorporé dans l'ADN. En conséquence, la synthèse de la chaîne d'ADN s'arrête puisque les analogues de nucléosides sont dépourvus d'un groupement 3'-OH [86]. Ensuite, la fonction de l'ORF58 est également inconnue, mais la protéine est l'homologue de UL3 chez HSV-1, qui est impliquée dans l'assemblage des virions en coopération avec UL4 [87]. À propos de l'ORF59, il s'agit d'une uracile ADN glycosylase qui répare les dommages à l'ADN causés par l'incorporation d'uracile [88]. Enfin, les rôles de l'ORF65 n'ont pas encore été rapportés mais sa protéine homologue chez HSV-1 (US9) fait partie du tégument [89]. En conséquence, les protéines encodées par l'ORF1, l'ORF3, l'ORF36, l'ORF58, l'ORF59 et l'ORF65 jouent divers rôles durant le cycle réPLICATIF viral, mais ne semblent pas être impliqués dans le phénomène d'inhibition des GS. La deuxième raison qui pourrait expliquer pourquoi ce n'est pas si surprenant que les 6 ORFs étudiés ne soient pas impliqués dans le phénomène d'inhibition

des GS est que ce sont des protéines dispensables. En effet, il est logique de penser que la délétion de la/de(s) protéine(s) de VZV responsable(s) de l'inhibition engendrerait un défaut de croissance plus ou moins important en culture cellulaire. En conséquence, il pourrait être judicieux de revoir la stratégie sur laquelle se base la librairie de délétant. Plutôt que d'évaluer les 71 ORFs de VZV, une expérience de cinétique d'inhibition des GS prend tout son sens. En effet, l'identification du moment précis à partir duquel l'inhibition a lieu permettrait de réduire la fenêtre de travail à quelques protéines exprimées à ce moment précis de l'infection. Cela nécessite néanmoins de pouvoir synchroniser l'infection et donc de réaliser l'infection à l'aide de particules libres de VZV. Cette condition a fait naître des problématiques, comme cela va être décrit dans la suite de la discussion.

4) Cinétique d'inhibition des GS par VZV

L'acide phosphonoacétique a été décrit dans la littérature comme un composé antiviral grâce à son activité inhibitrice de l'ADN polymérase des Herpèsvirus. Plus précisément, il s'agit d'un analogue de pyrophosphate qui bloque la libération de pyrophosphate qui a lieu à chaque fois qu'un dNTP est incorporé dans la chaîne d'ADN en cours de synthèse [90]. Ainsi, seuls les gènes à cinétique *Late* sont dépendants de la réPLICATION de l'ADN viral et ne sont donc pas censés être exprimées lorsqu'un traitement au PAA est appliqué [19]. C'est dans cette optique que la cinétique d'inhibition des GS par VZV a été étudiée afin de déterminer si l'absence de l'expression des gènes L influence ce processus. À cette fin, des ARPE-19 ont été infectées par des particules libres fraîchement produites à partir de cellules infectées par VZV WT de manière à synchroniser l'infection. Après une heure, le milieu des cellules a été remplacé par du milieu frais ou du milieu contenant du PAA pendant des temps croissants. Ainsi, l'impact du PAA sur la croissance virale a été évalué et des expériences d'immunofluorescence ont permis la visualisation des GS dans plusieurs conditions.

Tout d'abord, la croissance de VZV a été étudiée en absence et en présence de PAA (**figure 15**). Puisqu'il est estimé qu'un cycle complet menant à la réPLICATION du virus dure entre 12 et 16h, des images ont été prises pendant 72h afin de visualiser plusieurs cycles de réPLICATION [23]. Dans les conditions de contrôle il a été observé que la surface occupée par la GFP émise par le virus dans les puits reste constante au cours des 24 premières heures d'infection, puis

augmente de façon importante au cours du temps. Ensuite, deux concentrations en PAA ont été testées : 0,5 et 1 mg/mL. Quelle que soit la concentration en PAA utilisée, le nombre et la taille des foyers d'infection n'augmentent pas au cours du temps. Ainsi, puisqu'aucune différence notable n'a été observée entre les deux concentrations, c'est la plus faible qui a été choisie afin de réaliser les expériences d'immunofluorescence. De plus, ces données confirment les données issues de la littérature qui stipulent que le virus est incapable de se répliquer correctement en présence d'acide phosphonoacétique. Toutefois, la cinétique obtenue n'est pas exactement celle décrite, car le signal aurait déjà dû augmenter à 12-16h post-infection.

Ensuite, les GS ont été visualisées par immunofluorescence dans différentes conditions : avec ou sans traitement à l'arsénite, en absence ou en présence de PAA. Le premier graphe de cette section (**figure 16a**) illustre la cinétique d'apparition des GS spontanées (c'est-à-dire sans traitement à l'arsénite) et en absence de PAA. Parmi les cellules non infectées, très peu sont positives aux GS, signe que les cellules ne subissent qu'un stress très léger. En revanche, dans les cellules infectées le pourcentage de cellules possédant des GS est faible à 4h (13%) puis est fortement augmenté à 6h, puis oscille entre 40 et 60%. Ainsi, les GS spontanées sont formées dès 6 heures après l'infection. De façon surprenante, un taux extrêmement important de GS spontanées a été observé dans les cellules infectées. En effet, lorsque des ARPE-19 sont infectées par VZV avec des cellules isolées ou par co-culture pendant 24h, seulement 5 à 10% de GS se forment spontanément (**figure 9b**). Lors de cette expérience où l'infection est réalisée avec des particules libres, ce pourcentage oscille entre 13 et 55% sur quelques heures d'infection seulement (**figure 16a**). Notons que VZV est connu pour être un virus fortement associé aux cellules et se propage *in vivo* via des contacts cellulaires. Or, dans l'optique de synchroniser l'infection, ce sont des particules libres du virus qui ont été utilisées, suggérant que l'entrée de VZV autrement que par un contact cellule-cellule génère un stress important pour les cellules. Cette apparition massive de granules de stress dans les cellules infectées pourrait également s'expliquer par une synergie entre le mode d'infection du virus et la composition de l'inoculum. En effet, lorsque les particules libres sont produites à partir de ARPE-19 infectées par VZV, les cellules sont grattées dans du PGSC puis soniquées et il n'y a pas d'étape de purification. La sonication lyse les membranes et ce ne sont pas uniquement les virions qui sont récupérés, mais également des acides nucléiques et des protéines d'origine

cellulaire et virale, des lipides, etc. Ces constituants cellulaires et viraux sont susceptibles de représenter un stress pour les cellules (PAMPs et DAMPs). En conséquence, ces nombreux composants pourraient être détectés par des PRRs qui initient la production d'IFN de type I, menant à la transcription de nombreux ISG présentant une activité antivirale. Parmi les PRRs qui pourraient être impliqués, citons le TLR3, le TLR8, MDA5 et RIG-I, qui reconnaissent différents types d'ARN, cGAS qui est un senseur de l'ADN mitochondrial et de certains ADN viraux, ou encore le TLR2, le TLR4 et NLRP3 qui reconnaissent des protéines cellulaires, notamment les histones [91]. Parmi les ISG transcrits en réponse à la production d'IFN, on retrouve notamment la kinase PKR qui assure la détection de l'ARNdb viral. En étant activé, PKR bloquerait l'initiation de la traduction et induirait la formation de GS. Or, des données préalablement obtenues au sein du laboratoire mais non publiées ont démontré l'incapacité de VZV à inhiber la formation des GS issues de l'activation de la kinase PKR. Cela pourrait expliquer pourquoi un si grand nombre de GS spontanées sont présentes dans ces conditions, mais également pourquoi il est difficile de produire du virus libre de VZV avec des titres viraux importants. Par contre, puisque les cellules non infectées ne présentent pas de GS dans ces conditions, ces composants cellulaires et viraux présents dans l'inoculum ne peuvent pas être les seuls responsables de l'augmentation importante de cellules infectées positives aux GS. L'hypothèse qui en découle est donc la suivante : l'entrée de VZV autrement que par un contact cellule-cellule, en plus d'une quantité importante de macromolécules d'origine cellulaire et/ou virale dans l'inoculum, déclenchaient la formation de GS dépendamment de l'activation de la kinase PKR que VZV est incapable d'inhiber. Pour confirmer cette hypothèse et déterminer si c'est réellement l'inoculum qui est responsable de la formation de ces GS spontanées, une étape de purification des particules virales serait nécessaire. Tout d'abord, le produit de sonication pourrait être traité à la DNase et/ou à la RNase avant l'utilisation de l'inoculum. Si ce traitement s'avérait insuffisant, une étape de centrifugation après la sonication, suivie d'une ultracentrifugation et d'une purification des particules libres sur un gradient de sucre pourraient s'ajouter au protocole de purification.

Le second graphique de cette section (**figure 16b**) met en évidence l'apparition des GS en réponse à un traitement à l'arsénite, en l'absence de PAA. Tout d'abord, le pourcentage de cellules non infectées positives aux GS est quasiment maximal, démontrant la capacité de l'arsénite à induire un stress cellulaire. Toutefois, ce pourcentage est bien plus faible pour les

cellules infectées puisqu'il est majoritairement inférieur à 10%. Il a donc été surprenant d'observer que le nombre de cellules infectées positives aux GS était largement inférieur en présence d'arsénite, par rapport à l'absence d'arsénite. Ainsi, en présence d'arsénite, VZV est capable de restaurer sa capacité à inhiber les GS. De plus, puisque la différence entre les deux conditions est fortement marquée à partir de 6h post-infection, cela suggère que la protéine responsable de l'inhibition serait exprimée dès 6h d'infection. Ceci conduit à compléter l'hypothèse précédente : l'entrée de VZV autrement que par un contact cellule-cellule, en plus d'une quantité importante de macromolécules d'origine cellulaire et/ou virale dans l'inoculum, déclenchent la formation de GS dépendamment de l'activation de la kinase PKR que VZV est incapable d'inhiber. L'ajout d'arsénite pendant les 30 dernières minutes de chaque temps d'infection conduit à la disparition de GS dans une grande proportion de cellules infectées. Il est donc raisonnable de supposer que VZV n'interfère pas avec le processus d'assemblage des GS, mais serait plutôt responsable de leur désassemblage et que l'arsénite est capable d'activer cette fonction de désassemblage. Des données préliminaires non publiées et obtenues au sein du laboratoire sont en faveur de cette hypothèse de désassemblage ; VZV n'interfère pas avec l'activation des kinases eIF2 α ou avec la phosphorylation de eIF2 α , peu importe le stress, et il ne clive pas G3BP1. Le phénomène de désassemblage pourrait être confirmé en transfectant du poly(I:C) dans des cellules pour stimuler PKR, puis en traitant ou non avec de l'arsénite pour activer HRI afin de voir si les GS disparaissent. De surcroît, la manière dont l'arsénite stimule la/les protéine(s) virale(s) responsable(s) du désassemblage est sujette à la discussion. En réalité, HRI pourrait soit agir directement en phosphorylant la protéine de VZV, soit agir indirectement. Des expériences de co-immunoprecipitation pourraient être réalisées afin de déterminer les partenaires d'interaction de HRI. Il est toutefois possible que ce ne soit pas la kinase HRI qui soit impliquée, mais la molécule d'arsénite en elle-même. En effet, cette molécule pourrait stimuler d'autres voies signalétiques menant à l'activation de la protéine de VZV responsable de l'inhibition. Pour étudier cette hypothèse, il pourrait être intéressant de stimuler les cellules à l'arsénite tout en réprimant l'expression de HRI.

Le troisième graphique (**figure 17a**) illustre l'influence du PAA sur l'apparition des GS spontanées. Tout d'abord, l'ajout du PAA initie un léger stress pour les cellules, puisque le pourcentage de cellules non infectées positives aux GS est toujours modérément supérieur,

par rapport à la condition sans PAA. Toutefois, aucun effet du PAA n'a été observé sur les cellules infectées, à l'exception du temps 6h. En effet, une diminution du taux de cellules infectées possédant des GS diminue fortement à 6h par rapport à la condition sans PAA. Il se pourrait que l'étape de réPLICATION du génome viral, ou la transcription massive des gènes L qui la suit, participe à l'apparition spontanée des GS. Ainsi, le PAA empêche ces étapes de se dérouler, d'où la diminution observée. Toutefois, cette hypothèse est peu probable car, si c'était le cas, une diminution aurait également été observée aux temps ultérieurs, ce qui n'est pas le cas. Il est donc nécessaire de refaire l'expérience afin de déterminer si cette diminution à 6h post-infection est reproductible.

Sur le quatrième graphique (**figure 17b**) est retrouvé l'influence du PAA sur l'apparition des GS en présence d'arsénite. Dans ce cas, le PAA ne semble pas avoir d'effet majeur sur les cellules non infectées. En revanche, sur les cellules infectées, le PAA a des effets difficilement interprétables à 4, 6 et 8h d'infection. Toutefois, il semble augmenter le pourcentage de cellules possédant des GS à 10h et 12h post-infection. Cela suggère donc que, à ce moment précis de l'infection, une protéine de VZV pourrait contribuer à l'inhibition des GS. Néanmoins, il a été surprenant d'observer qu'à 14h post-infection, ce phénomène n'est pas rencontré. Il est donc nécessaire de reproduire l'expérience avant de tirer toute conclusion.

Enfin, des réserves sont émises à propos des résultats visant à étudier la cinétique d'inhibition des GS par VZV car l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Les hypothèses proposées sont donc à confirmer en reproduisant l'expérience et en essayant d'améliorer la pureté de l'inoculum, comme proposé précédemment. En effet, cette contamination a permis d'établir une hypothèse sur le mécanisme utilisé par VZV pour inhiber les GS, mais elle empêche de tirer toute conclusion fiable quant à l'effet du PAA sur la cinétique d'inhibition des GS. De plus, au cours de cette expérience, une RT-qPCR avait été réalisée afin d'étudier l'expression des gènes de VZV au cours de l'infection et confirmer l'effet inhibiteur du PAA sur l'expression des gènes tardifs. Néanmoins, les résultats n'ont pas été présentés car ils étaient difficilement interprétables, probablement à cause de la contamination en acides nucléiques de l'inoculum. En effet, l'expression de toutes les classes cinétiques de VZV avait été étudiée : les gènes IE (IE4, IE61, IE63), TE (ORF16, gL), EL (ORF29, gB), LL (ORF6, gK) et TL (ORF10, ORF40, gC). Les résultats indiquaient cependant une expression de tous les gènes à 0h d'infection et,

quelle que soit leur classe cinétique, tous les gènes avaient le même profil d'expression. Le signal détecté proviendrait donc des acides nucléiques issus de l'inoculum et non pas du cycle réplicatif de VZV.

ANNEXES

1) Figures supplémentaires

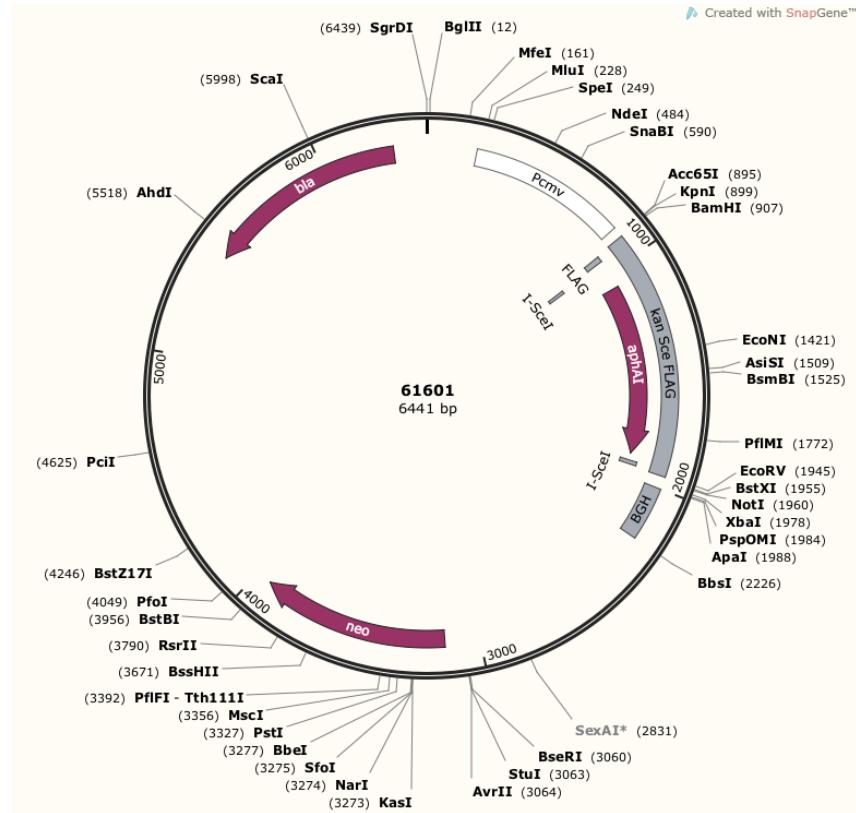
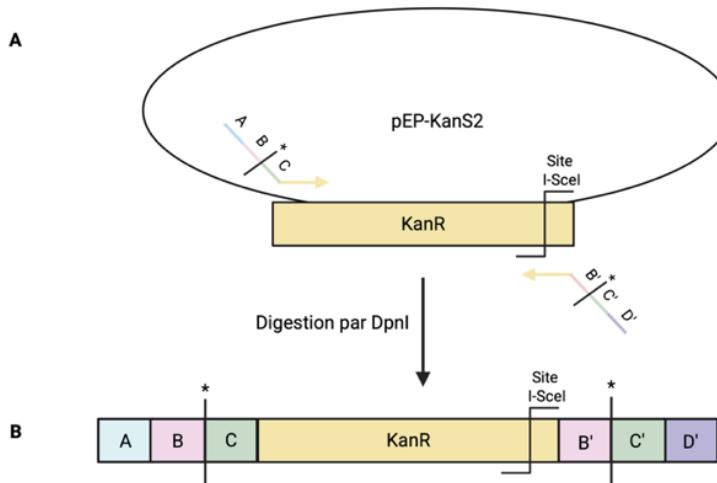


Figure S1. Carte de restriction du plasmide modèle pEP_Kan_S2 (<https://www.addgene.org/61601/>).



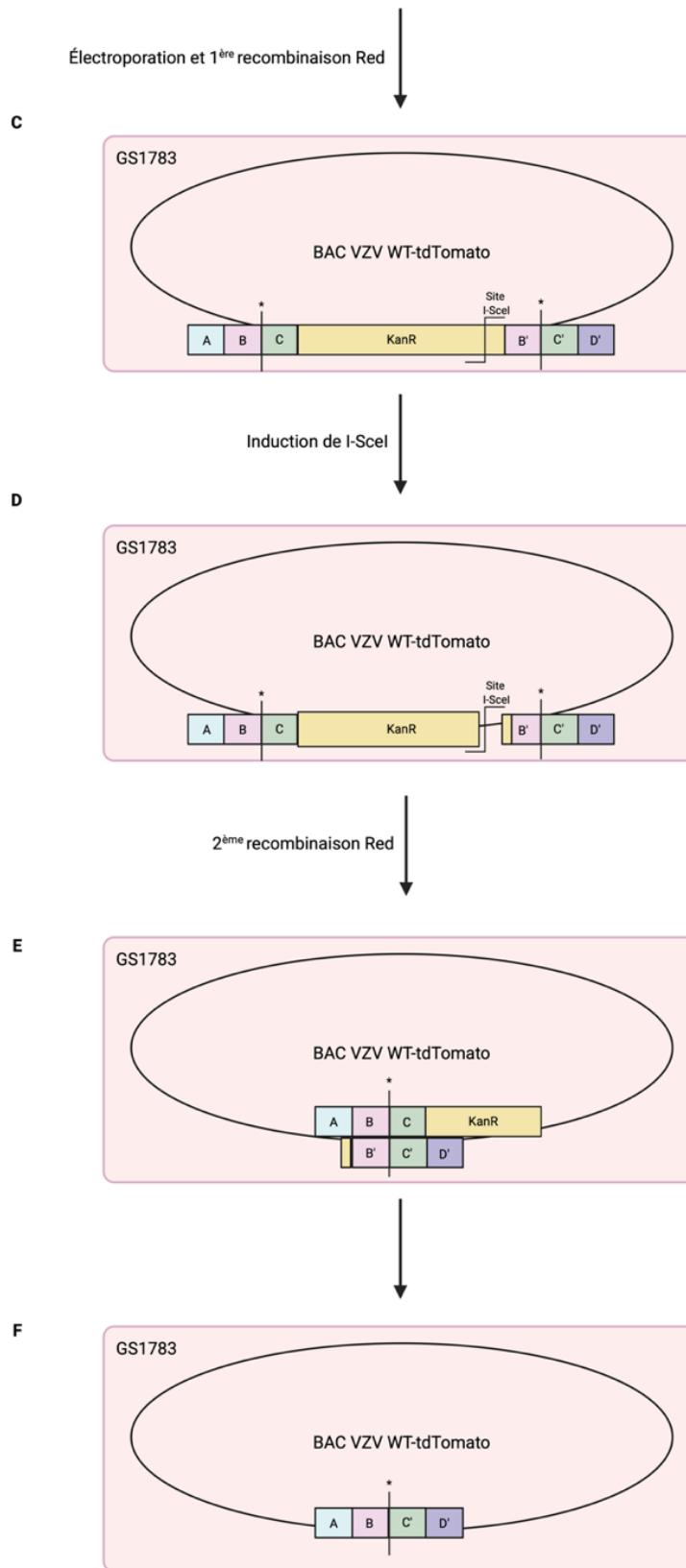


Figure S2 : Représentation schématique des différentes étapes du clonage « en-passant ». (A) L'introduction du codon de terminaison dans l'ORF a lieu dans les 30 premiers acides aminés de l'ORF. Une fois la mutation identifiée, des amorce sens et anti-sens sont conçues puis commandées sur le site <https://eu.idtdna.com/page/products> (tableau supplémentaire 1). Pour synthétiser l'amorce sens,

le codon codant est remplacé par le codon de terminaison (représenté par l'étoile *) puis une séquence flanquante de 60 pb a été identifiée, en divisant chaque segment de 20 pb en sections A (bleu), B (rose) et C (vert), la mutation se trouvant entre la section B et C. Ensuite, une séquence de 22 pb correspondant à KanR-*I-SceI* (jaune) est introduite en aval de la section C. La synthèse de l'amorce anti-sens nécessite d'autres sections de 20 pb : la section D' (violet) qui correspond au complément inversé de la séquence immédiatement en aval de la section C, les sections C' (vert) et B' (rose) qui sont les compléments inversés des sections B et C, avec la mutation comprise entre C' et B' et une séquence de 23 pb correspondant à KanR-*I-SceI* (jaune). La cassette contenant la mutation intégrée est synthétisée par PCR en utilisant le plasmide pEP_KanS2 comme template puisque ce dernier porte le gène de résistance à la kanamycine (KanR) et les sites de restriction de *I-SceI*. **(B)** Une digestion de l'ADN méthylé est réalisée par l'enzyme de restriction *DpnI* afin d'éliminer le template et purifier la cassette PCR. **(C)** La cassette est électroporée dans les GS1783 et le système de recombinaison Red est induit à 42°C afin d'introduire la cassette par recombinaison homologue dans le BAC VZV WT-tdTomato. **(D)** En présence d'arabinose, l'endonucléase *I-SceI* est exprimée et réalise une cassure double brin au niveau des sites de restriction qui flanquent KanR. **(E)** Le système Red est à nouveau activé à 42°C afin de réparer la cassure double brin dans l'ADN et **(F)** permettre l'intégration de la mutation d'intérêt dans le génome de VZV, par recombinaison homologue entre B-B' et C-C'. Schéma réalisé avec <https://www.biorender.com/> et adapté de [92].

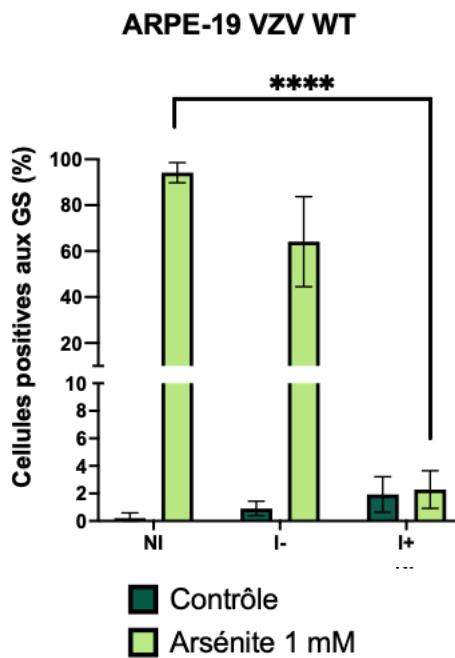


Figure S3 : Inhibition des granules de stress par VZV WT. Pourcentage de cellules positives aux GS dans les cellules non infectées (issues d'une lame dépourvue d'infection, NI), dans les cellules non infectées autour des cellules infectées (I-) et dans les cellules infectées par VZV WT (I+), dans des conditions de contrôle (en vert foncé) ou de traitement (en vert clair). Un total de 150 cellules I+ a été compté et les cellules sont considérées comme positives aux GS lorsqu'elle en possède au moins 5. L'expérience a été réalisée 6 fois et un t-test non pairé a été effectué (****p<0,0001).

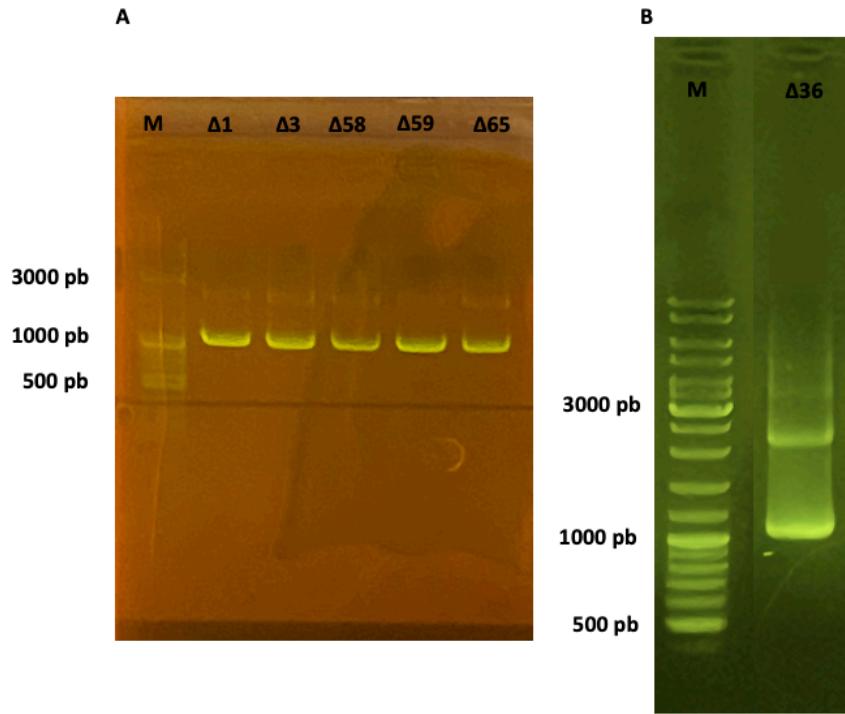
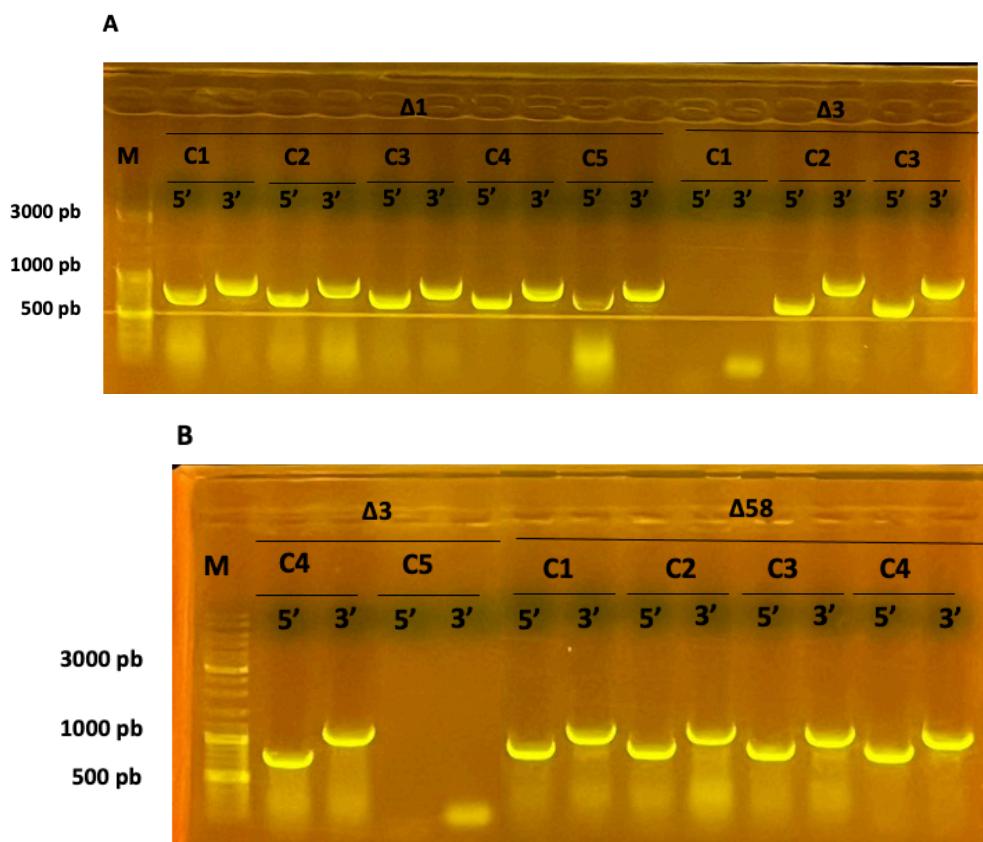


Figure S4 : Screening des cassette PCR par électrophorèse pour $\Delta 1$, $\Delta 3$, $\Delta 36$, $\Delta 58$, $\Delta 59$ et $\Delta 65$.
Vérification de la taille de la cassette de recombinaison contenant la mutation d'intérêt et la séquence correspondant au gène de résistance à la kanamycine par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) après amplification par PCR. M correspond au marqueur de poids moléculaire (en pb) et Δ correspond à la cassette contenant la mutation pour l'ORF d'intérêt (ORF1, ORF3, ORF36, ORF58, ORF59 et ORF65).



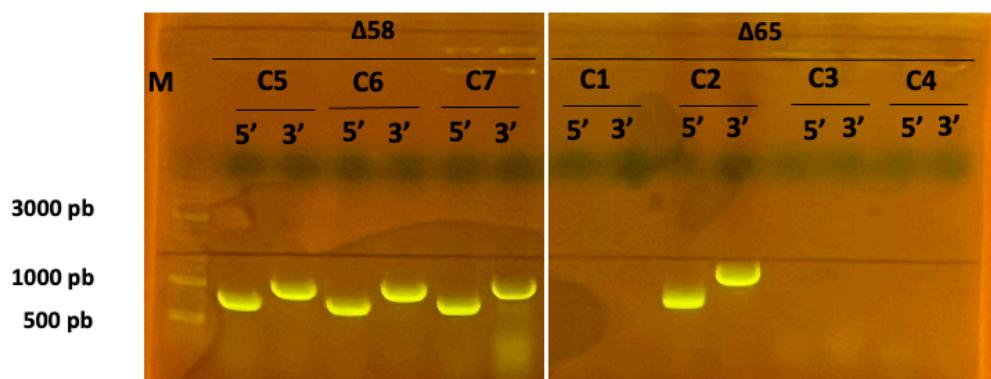
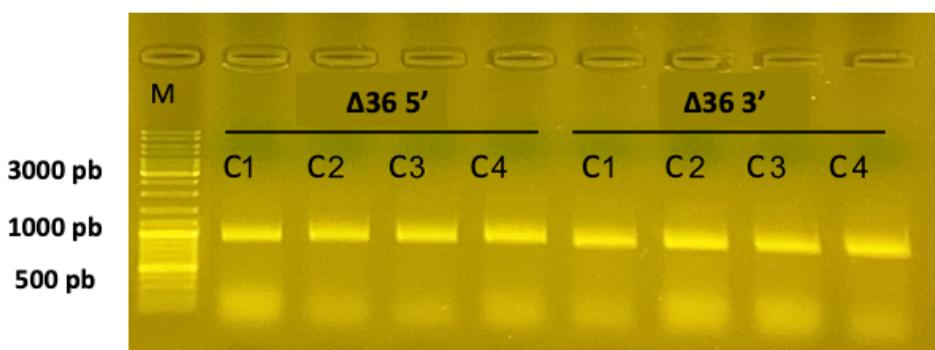
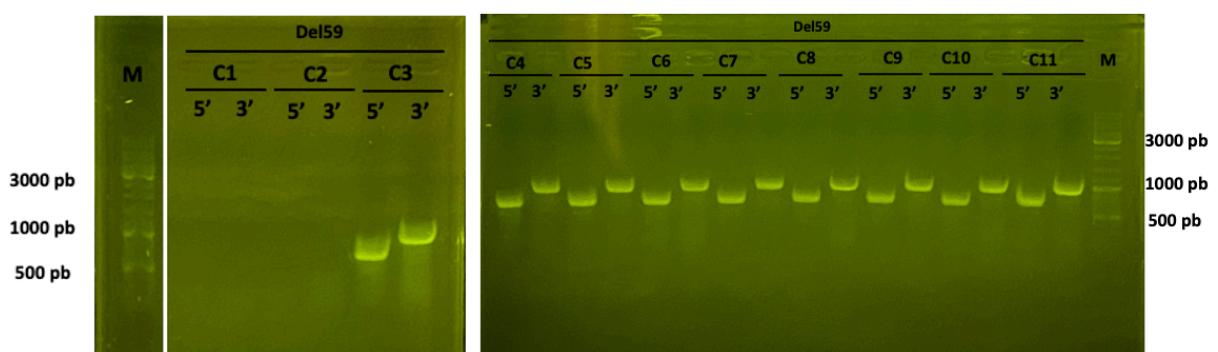
C**D****E**

Figure S5 : Screening des clones parents par électrophorèse pour $\Delta 1$, $\Delta 3$, $\Delta 36$, $\Delta 58$, $\Delta 59$ et $\Delta 65$.
Vérification de la taille de la cassette de recombinaison (incorporée dans les souches GS1783 d'*E. coli* par électroporation) par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) après amplification par PCR. M correspond au marqueur de poids moléculaire (en pb). Les cinq clones présentent une insertion correcte de la cassette kanamycine dans l'ORF1.

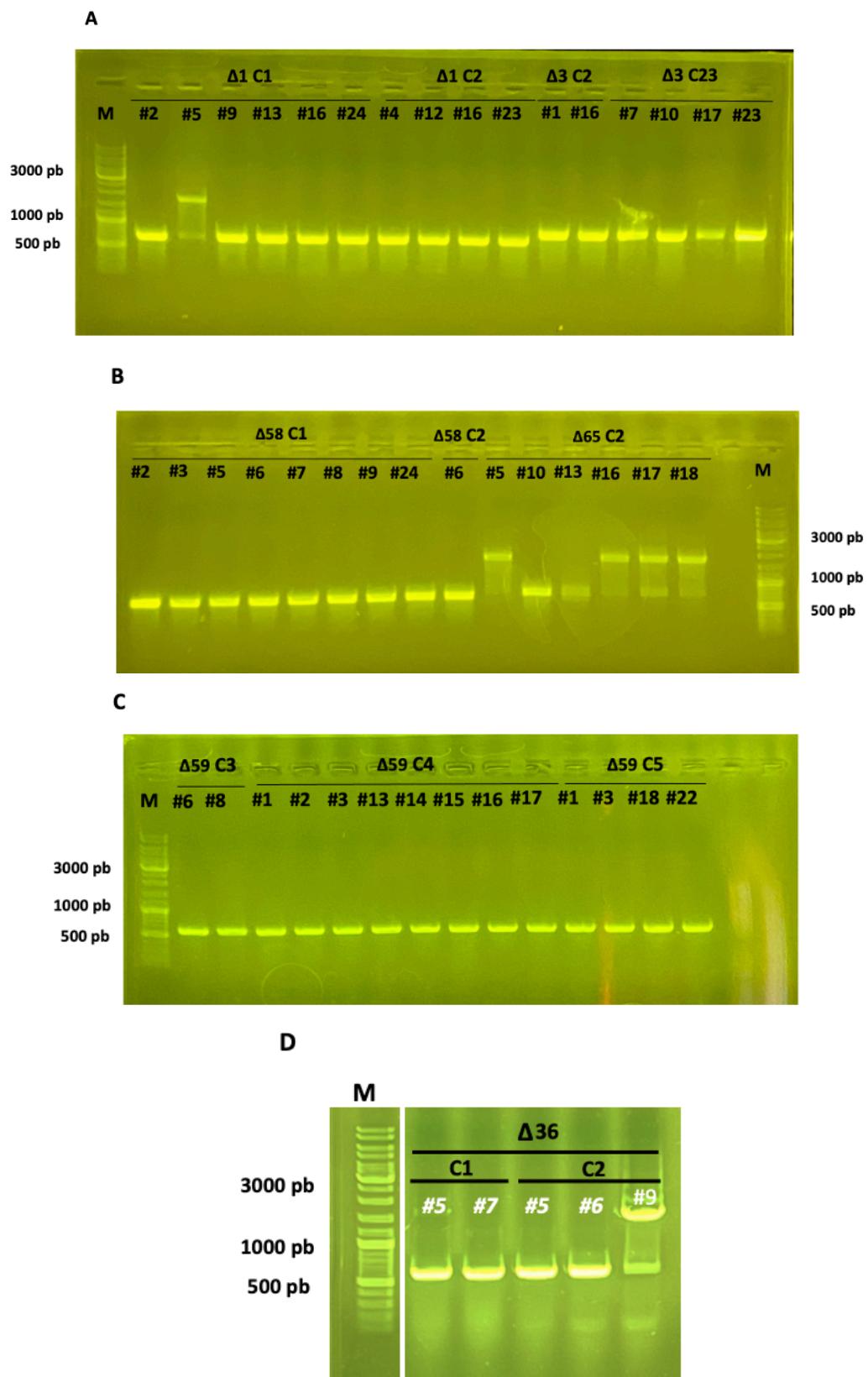


Figure S6 : Screening par PCR de la deuxième étape de recombinaison pour $\Delta 1$, $\Delta 3$, $\Delta 36$, $\Delta 58$, $\Delta 59$ et $\Delta 65$. PCR sur colonie de clones qui ont perdu la capacité de croître en présence de kanamycine. La taille des produits d'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). M correspond au marqueur de poids moléculaire (en pb).

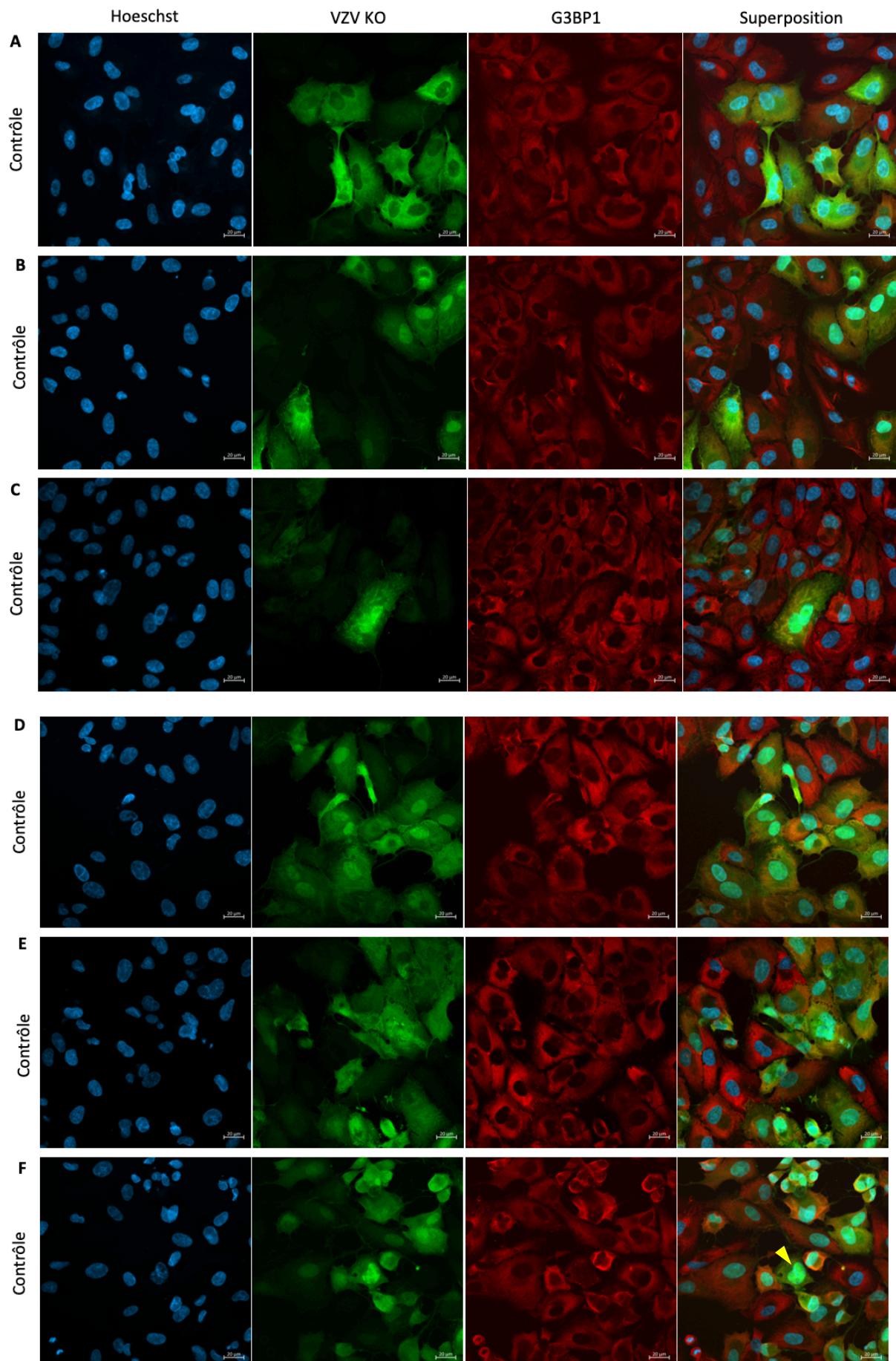


Figure S7 : Inhibition des granules de stress par VZV Δ 1, Δ 3, Δ 36, Δ 58, Δ 59 et Δ 65. Immunofluorescence anti-G3BP1 (représenté en rouge) de ARPE-19 infectées par VZV **(A)** Δ 1, **(B)** Δ 3, **(C)** Δ 36, **(D)** Δ 58, **(E)** Δ 59, **(F)** Δ 65 et traitées à l'arsénite de sodium (1 mM pendant 30 min). Les noyaux sont marqués au Hoescht (bleu) et les souches de VZV KO expriment la protéine fluorescente Td-Tomato (représenté en vert). Pour chaque condition, un z-stack a été réalisé, avec une acquisition d'image tous les 50 μ m.

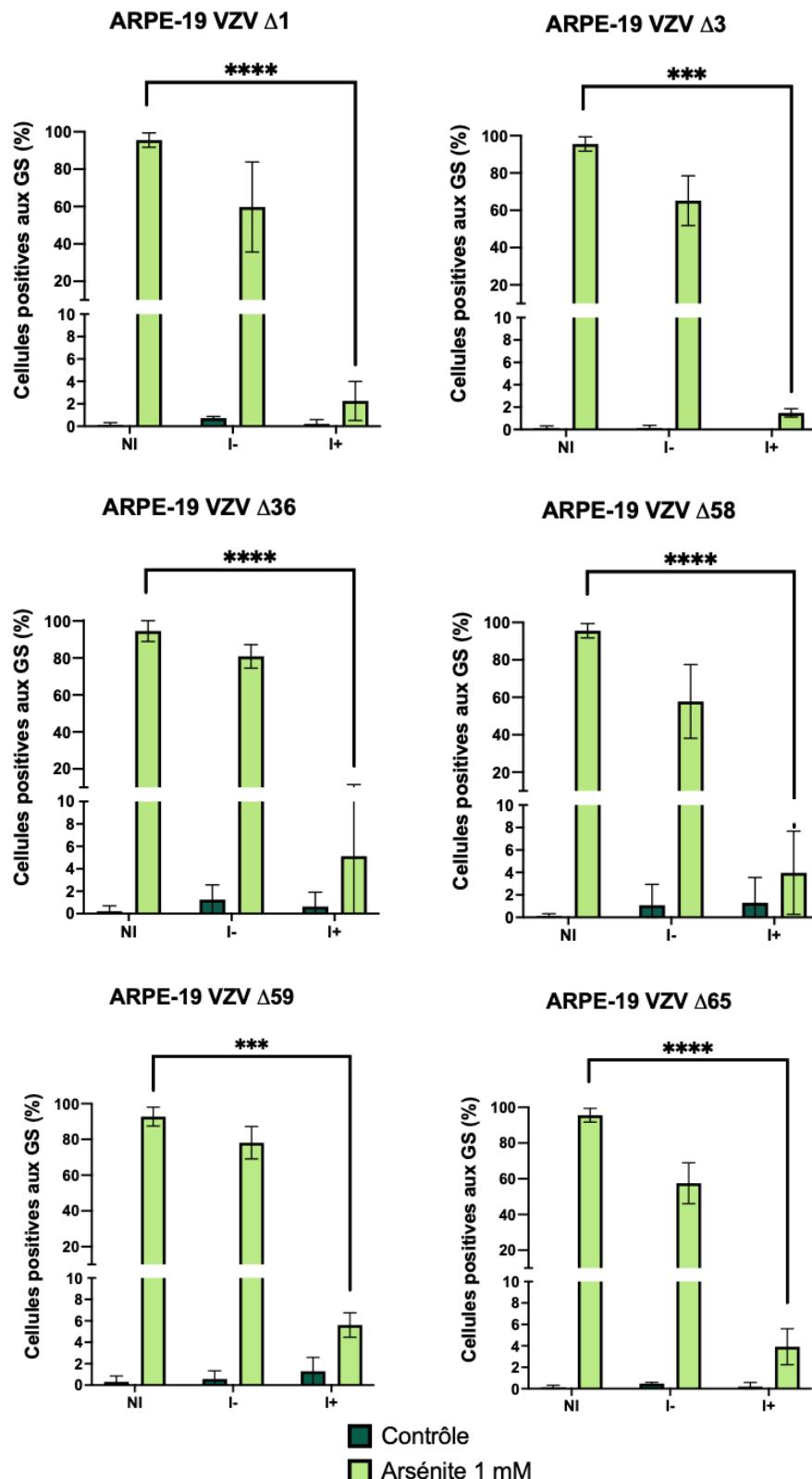


Figure S8 : Inhibition des granules de stress par VZV Δ1, Δ3, Δ36, Δ58, Δ59 et Δ65. Pourcentage de cellules positives aux GS dans les cellules non infectées (issues d'une lame dépourvue d'infection, NI), dans les cellules non infectées autour des cellules infectées (I-) et dans les cellules infectées par VZV KO (I+), dans des conditions de contrôle (en vert foncé) ou de traitement (en vert clair). Un total de 150 cellules I+ a été compté et les cellules sont considérées comme positives aux GS lorsqu'elles en possède au moins 5. L'expérience a été réalisée 3 fois (sauf pour Δ36 où l'expérience a été réalisée 4 fois) et un t-test non pairé a été effectué (**p=0,0002, ***p<0,0001).

2) Tableaux supplémentaires

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
Amorces pour l'introduction du codon STOP	
1del_kana_F1	TTCGGGAATCTGATAGCGATAACAGACTCTGTGTTATGTA G CAGCATACAGAGCTTA TGCAAGGATGACGACGATAAGTAGGG
1del_kana_R1	CGAGTGGCGACGCCGTTCTGCATAAGCTCTGTATGCT G CTACATAAACACAGAG TCTGTGCCAGTGTACAACCAATTAAACC
3del_kana_F1	GGGAGCTCCGAAAGCAGTCAACCCATCCGAGTGAATCTTAAACCTGACCCGTTG GCGTCGAGGATGACGACGATAAGTAGGG
3del_kana_R1	GGCGGTATAACTTGTGAAACGACGCCAACGGTCAGGT A AGATTCACTCGGAT GGGTTGCCAGTGTACAACCAATTAAACC
36del_kana_F1	TTTGGACGGGGCGTATGGAATTGGAAAAACAACCGCCGCT A GAATTTCACACC ACTTTAGGATGACGACGATAAGTAGGG
36del_kana_R1	ATCCGGTTGGTATTGCAAAGTGGTGTAAAATTCTT A GGCGGCGGTGTTTC CAAGCCAGTGTACAACCAATTAAACC
58del_kana_F1	ATAATGTTTCGGAGTTGCCTCCTCCGTACCGACGGCAT A GCTCAATGGGTTG GGGATAGGATGACGACGATAAGTAGGG
58del_kana_R1	CGAACACGGTCCACGATGCAATCCCCACCCATTGAAGCT A TGCCGTCGGTAC GGAAGGAGCCAGTGTACAACCAATTAAACC
59del_kana_F1	TTCCAACCGGTATGCCAATGAAATGAAACTATCGGATTCA T AGGACATTATGTTT GGCCAGGATGACGACGATAAGTAGGG
59del_kana_R1	GTTTTTTGGTAACCGGATGGGCCAAACATAATGTCCT T GAATCCGATAGTTCA TTGCCAGTGTACAACCAATTAAACC
65del_kana_F1	ACAAAACACCATGGAGGGTGAGGCCGTGGCCTACTGATGTAAGCGGTGGTAAC CCCGCGAAGGATGACGACGATAAGTAGGG

65del_kana_R1	GTTGTATTATTGGTTCGCCTCGCAGGGTACCCACCGCTTACATCAGTAAGGCCA CGGCCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
Amorces pour le séquençage des mutants	
seqORF1_Fw	CGAGGAACCTCCAACTCAACTAC
seqORF1_Rv	GGGCAGTCATGCTCAGAAACAAG
seqORF3_Fw	GCCATTCCGGTAACAGTCGTTG
seqORF3_Rv	GCGAGTGTGGTCGTGTTGAATG
seqORF36_Fw	GTCCCGAAACCTCGACGTAC
seqORF36_Rv	CATATAGTTGAGGCGATTGGGTGTC
seqORF58_Fw	CAGGCGTTCATATAAGCTGC
seqORF58_Rv	GCTGAATACCACGCTTACGGTTC
seqORF59_Fw	GTTCGTCCGACAACAGGTACACC
seqORF59_Rv	CCGTGCGTGTACCGTATATG
seqORF65_Fw	CCGCTCCCGTCATAGCAAATAC
seqORF65_Rv	CAACAGTACCGGAATGCCAAGC
seqKanF	GCATGGTTACTCACCACTGCG
seqKanR	GTTCAACAGGCCAGCCATTACG

Tableau S1 : Amorces utilisées pour les différentes PCR réalisées.

Étape	Température	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	60	1
Dénaturation	95°C	30	20
Hybridation	65°C avec une perte de 0,5°C à chaque cycle	30	
Élongation	72°C	75	
Dénaturation	95°C	30	15
Hybridation	62°C	30	
Élongation	72°C	75	
Élongation finale	72°C	300	1

Tableau S2 : Cycles de la PCR permettant de générer la cassette pour le clonage « en-passant ».

Étape	Température	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	300	1
Dénaturation	95°C	30	35
Hybridation	58°C	30	
Élongation	72°C	45-60	
Élongation finale	72°C	300	1

Tableau S3 : Cycles de la PCR permettant d'amplifier la séquence d'intérêt dans les colonies de clones parents.

Nom de la protéine ciblée	Référence	Firme	Origine de production	Dilution réalisée
Anticorps primaires				
ORF1	HR-VZV-39	CapRi	Souris	1/1000
ORF3	HR-VZV-29	CapRi	Souris	1/1000
ORF58	HR-VZV-19	CapRi	Souris	1/1000
IE62	Clone 8616	Produit au laboratoire	Lapin	1/4000
β-tubuline	AB2315513	DSHB	Souris	1/5000
Anticorps secondaires				
Anti-souris	7076S	Cell signaling	Chèvre	1/4000
Anti-lapin	7074S	Cell signaling	Chèvre	1/4000

Tableau S4 : Anticorps utilisés pour le Western-blot.

Nom de la protéine ciblée	Référence	Firme	Origine de production	Dilution réalisée
Anticorps primaires				
G3BP1	13057-2AP	ProteinTech	Lapin	1/2000
IE63	Clone 9D12	Produit au laboratoire	Souris	1/1000
Anticorps secondaires				
Anti-lapin-CF633	SAB4600132	Merck	Singe	1/2000
Anti-lapin-CF568	SAB4600084	Merck	Chèvre	1/2000
Anti-souris-CF633	SAB4600131	Merck	Singe	1/2000

Tableau S5 : Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. R. Mushegian, « Are There 1031 Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? », *J. Bacteriol.*, vol. 202, n° 9, p. e00052-20, avr. 2020, doi: 10.1128/JB.00052-20.
- [2] E. V. Koonin, V. V. Dolja, et M. Krupovic, « The healthy human virome: from virus–host symbiosis to disease », *Curr. Opin. Virol.*, vol. 47, p. 86-94, avr. 2021, doi: 10.1016/j.coviro.2021.02.002.
- [3] H. V. Chaudhari, M. M. Inamdar, et K. Kondabagil, « Scaling relation between genome length and particle size of viruses provides insights into viral life history », *iScience*, vol. 24, n° 5, p. 102452, mai 2021, doi: 10.1016/j.isci.2021.102452.
- [4] J. Louten, « Chapter 2 - Virus Structure and Classification », in *Essential Human Virology*, J. Louten, Éd., Boston: Academic Press, 2016, p. 19-29. doi: 10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8.
- [5] S. Rampersad et P. Tennant, « Replication and Expression Strategies of Viruses », *Viruses*, p. 55-82, 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-811257-1.00003-6.
- [6] C. San Martín, « Virus Maturation », in *Physical Virology: Virus Structure and Mechanics*, U. F. Greber, Éd., Cham: Springer International Publishing, 2019, p. 129-158. doi: 10.1007/978-3-030-14741-9_7.
- [7] J. Luczkowiak, M. Álvarez, A. Sebastián-Martín, et L. Menéndez-Arias, « Chapter 4 - DNA-Dependent DNA Polymerases as Drug Targets in Herpesviruses and Poxviruses », in *Viral Polymerases*, S. P. Gupta, Éd., Academic Press, 2019, p. 95-134. doi: 10.1016/B978-0-12-815422-9.00004-8.
- [8] S. Zhu et A. Viejo-Borbolla, « Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus », *Virulence*, vol. 12, n° 1, p. 2670-2702, doi: 10.1080/21505594.2021.1982373.
- [9] J. I. Cohen, « The varicella-zoster virus genome », *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 342, p. 1-14, 2010, doi: 10.1007/82_2010_10.
- [10] A. A. Gershon *et al.*, « Varicella zoster virus infection », *Nat. Rev. Dis. Primer*, vol. 1, p. 15016, juill. 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.16.
- [11] M. M. Albà, R. Das, C. A. Orengo, et P. Kellam, « Genomewide function conservation and phylogeny in the Herpesviridae », *Genome Res.*, vol. 11, n° 1, p. 43-54, janv. 2001, doi: 10.1101/gr.149801.
- [12] G. Freer et M. Pistello, « Varicella-zoster virus infection: natural history, clinical manifestations, immunity and current and future vaccination strategies », *New Microbiol.*, vol.

41, n° 2, p. 95-105, avr. 2018.

- [13] P. G. E. Kennedy, T. H. Mogensen, et R. J. Cohrs, « Recent Issues in Varicella-Zoster Virus Latency », *Viruses*, vol. 13, n° 10, p. 2018, oct. 2021, doi: 10.3390/v13102018.
- [14] A. Patil, M. Goldust, et U. Wollina, « Herpes zoster: A Review of Clinical Manifestations and Management », *Viruses*, vol. 14, n° 2, p. 192, janv. 2022, doi: 10.3390/v14020192.
- [15] J. Sun *et al.*, « Cryo-EM structure of the varicella-zoster virus A-capsid », *Nat. Commun.*, vol. 11, n° 1, p. 4795, sept. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18537-y.
- [16] L. Zerboni, N. Sen, S. L. Oliver, et A. M. Arvin, « Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, n° 3, p. 197-210, mars 2014, doi: 10.1038/nrmicro3215.
- [17] H. Liu *et al.*, « Research Progress on Varicella-Zoster Virus Vaccines », *Vaccines*, vol. 13, n° 7, p. 730, juill. 2025, doi: 10.3390/vaccines13070730.
- [18] R. J. Cohrs, M. P. Hurley, et D. H. Gilden, « Array Analysis of Viral Gene Transcription during Lytic Infection of Cells in Tissue Culture with Varicella-Zoster Virus », *J. Virol.*, vol. 77, n° 21, p. 11718-11732, nov. 2003, doi: 10.1128/JVI.77.21.11718-11732.2003.
- [19] S. E. Braspenning, T. Sadaoka, J. Breuer, G. M. G. M. Verjans, W. J. D. Ouwendijk, et D. P. Depledge, « Decoding the Architecture of the Varicella-Zoster Virus Transcriptome », *mBio*, vol. 11, n° 5, p. 10.1128/mbio.01568-20, oct. 2020, doi: 10.1128/mbio.01568-20.
- [20] W. L. Gray, « Comparative Analysis of the Simian Varicella Virus and Varicella Zoster Virus Genomes », *Viruses*, vol. 14, n° 5, p. 844, avr. 2022, doi: 10.3390/v14050844.
- [21] Z. Zhang *et al.*, « Genome-Wide Mutagenesis Reveals That ORF7 Is a Novel VZV Skin-Tropic Factor », *PLoS Pathog.*, vol. 6, n° 7, p. e1000971, juill. 2010, doi: 10.1371/journal.ppat.1000971.
- [22] S. L. Oliver, « The Structures and Functions of VZV Glycoproteins », *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 438, p. 25-58, 2023, doi: 10.1007/82_2021_243.
- [23] M. Reichelt, J. Brady, et A. M. Arvin, « The Replication Cycle of Varicella-Zoster Virus: Analysis of the Kinetics of Viral Protein Expression, Genome Synthesis, and Virion Assembly at the Single-Cell Level », *J. Virol.*, vol. 83, n° 8, p. 3904-3918, avr. 2009, doi: 10.1128/JVI.02137-08.
- [24] C. Tommasi et J. Breuer, « The Biology of Varicella-Zoster Virus Replication in the Skin », *Viruses*, vol. 14, n° 5, p. 982, mai 2022, doi: 10.3390/v14050982.
- [25] A. M. Arvin, « Creating the “Dew Drop on a Rose Petal”: the Molecular

Pathogenesis of Varicella-Zoster Virus Skin Lesions », *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*, vol. 87, n° 3, p. e0011622, sept. 2023, doi: 10.1128/mmbr.00116-22.

- [26] C. Grose, E. M. Buckingham, J. E. Carpenter, et J. P. Kunkel, « Varicella-Zoster Virus Infectious Cycle: ER Stress, Autophagic Flux, and Amphisome-Mediated Trafficking », *Pathog. Basel Switz.*, vol. 5, n° 4, p. 67, déc. 2016, doi: 10.3390/pathogens5040067.
- [27] S. Sucharita, A. Krishnagopal, et S. van Drunen Littel-van den Hurk, « Comprehensive Analysis of the Tegument Proteins Involved in Capsid Transport and Virion Morphogenesis of Alpha, Beta and Gamma Herpesviruses », *Viruses*, vol. 15, n° 10, p. 2058, oct. 2023, doi: 10.3390/v15102058.
- [28] P. G. E. Kennedy et A. A. Gershon, « Clinical Features of Varicella-Zoster Virus Infection », *Viruses*, vol. 10, n° 11, p. 609, nov. 2018, doi: 10.3390/v10110609.
- [29] D. P. Depledge, T. Sadaoka, et W. J. D. Ouwendijk, « Molecular Aspects of Varicella-Zoster Virus Latency », *Viruses*, vol. 10, n° 7, p. 349, juin 2018, doi: 10.3390/v10070349.
- [30] W. J. D. Ouwendijk *et al.*, « Varicella-zoster virus VLT-ORF63 fusion transcript induces broad viral gene expression during reactivation from neuronal latency », *Nat. Commun.*, vol. 11, n° 1, p. 6324, déc. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-20031-4.
- [31] D. P. Depledge *et al.*, « A spliced latency-associated VZV transcript maps antisense to the viral transactivator gene 61 », *Nat. Commun.*, vol. 9, n° 1, p. 1167, mars 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03569-2.
- [32] P. G. E. Kennedy, J. Rovnak, H. Badani, et R. J. Cohrs, « A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation », *J. Gen. Virol.*, vol. 96, n° Pt 7, p. 1581-1602, juill. 2015, doi: 10.1099/vir.0.000128.
- [33] S. W. P. L. Daulagala et F. Noordeen, « Epidemiology and factors influencing varicella infections in tropical countries including Sri Lanka », *VirusDisease*, vol. 29, n° 3, p. 277-284, sept. 2018, doi: 10.1007/s13337-018-0459-z.
- [34] S. Lolekha *et al.*, « Effect of climatic factors and population density on varicella zoster virus epidemiology within a tropical country », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 64, n° 3-4, p. 131-136, 2001, doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.131.
- [35] A. Sauerbrei, « Diagnosis, antiviral therapy, and prophylaxis of varicella-zoster virus infections », *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, vol. 35, n° 5, p. 723-734, mai 2016, doi: 10.1007/s10096-016-2605-0.
- [36] G. Andrei et R. Snoeck, « Advances and Perspectives in the Management of Varicella-Zoster Virus Infections », *Mol. Basel Switz.*, vol. 26, n° 4, p. 1132, févr. 2021, doi:

10.3390/molecules26041132.

- [37] T. Pradeu, B. P. H. J. Thomma, S. E. Girardin, et B. Lemaitre, « The conceptual foundations of innate immunity: Taking stock 30 years later », *Immunity*, vol. 57, n° 4, p. 613-631, avr. 2024, doi: 10.1016/j.jimmuni.2024.03.007.
- [38] Y. C. Martins, F. L. Ribeiro-Gomes, et C. T. Daniel-Ribeiro, « A short history of innate immunity », *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 118, p. e230023, doi: 10.1590/0074-02760230023.
- [39] S. R. El-Zayat, H. Sibaii, et F. A. Manna, « Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview », *Bull. Natl. Res. Cent.*, vol. 43, n° 1, p. 187, déc. 2019, doi: 10.1186/s42269-019-0227-2.
- [40] M. Yoneyama, H. Kato, et T. Fujita, « Physiological functions of RIG-I-like receptors », *Immunity*, vol. 57, n° 4, p. 731-751, avr. 2024, doi: 10.1016/j.jimmuni.2024.03.003.
- [41] Y.-M. Loo et M. Gale, « Immune signaling by RIG-I-like receptors », *Immunity*, vol. 34, n° 5, p. 680-692, mai 2011, doi: 10.1016/j.jimmuni.2011.05.003.
- [42] J. Cui, Y. Chen, H. Y. Wang, et R.-F. Wang, « Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer », *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 10, n° 11, p. 3270-3285, janv. 2015, doi: 10.4161/21645515.2014.979640.
- [43] J. L. Shirley, Y. P. de Jong, C. Terhorst, et R. W. Herzog, « Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 28, n° 3, p. 709-722, mars 2020, doi: 10.1016/j.ymthe.2020.01.001.
- [44] C. Gerada *et al.*, « Manipulation of the Innate Immune Response by Varicella Zoster Virus », *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 1, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00001.
- [45] P. Vandevenne *et al.*, « The Varicella-Zoster Virus ORF47 Kinase Interferes with Host Innate Immune Response by Inhibiting the Activation of IRF3 », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 2, p. e16870, févr. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0016870.
- [46] A. Abendroth, P. R. Kinchington, et B. Slobedman, « Varicella Zoster Virus Immune Evasion Strategies », *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 342, p. 155-171, 2010, doi: 10.1007/82_2010_41.
- [47] S. R. Millar *et al.*, « A New Phase of Networking: The Molecular Composition and Regulatory Dynamics of Mammalian Stress Granules », *Chem. Rev.*, vol. 123, n° 14, p. 9036-9064, juill. 2023, doi: 10.1021/acs.chemrev.2c00608.
- [48] N. Ripin et R. Parker, « Are stress granules the RNA analogs of misfolded protein aggregates? », *RNA N. Y. N.*, vol. 28, n° 1, p. 67-75, janv. 2022, doi: 10.1261/rna.079000.121.

- [49] C. L. Riggs, N. Kedersha, P. Ivanov, et P. Anderson, « Mammalian stress granules and P bodies at a glance », *J. Cell Sci.*, vol. 133, n° 16, p. jcs242487, sept. 2020, doi: 10.1242/jcs.242487.
- [50] J.-Y. Youn *et al.*, « Properties of Stress Granule and P-Body Proteomes », *Mol. Cell*, vol. 76, n° 2, p. 286-294, oct. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.014.
- [51] P. Ivanov, N. Kedersha, et P. Anderson, « Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 11, n° 5, p. a032813, mai 2019, doi: 10.1101/cshperspect.a032813.
- [52] S. Hofmann, N. Kedersha, P. Anderson, et P. Ivanov, « Molecular mechanisms of stress granule assembly and disassembly », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1868, n° 1, p. 118876, janv. 2021, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118876.
- [53] K. Pakos-Zebrucka, I. Koryga, K. Mnich, M. Ljubic, A. Samali, et A. M. Gorman, « The integrated stress response », *EMBO Rep.*, vol. 17, n° 10, p. 1374-1395, oct. 2016, doi: 10.15252/embr.201642195.
- [54] N. Eiermann, K. Haneke, Z. Sun, G. Stoecklin, et A. Ruggieri, « Dance with the Devil: Stress Granules and Signaling in Antiviral Responses », *Viruses*, vol. 12, n° 9, p. 984, sept. 2020, doi: 10.3390/v12090984.
- [55] M. Baymiller et S. L. Moon, « Stress Granules as Causes and Consequences of Translation Suppression », *Antioxid. Redox Signal.*, août 2023, doi: 10.1089/ars.2022.0164.
- [56] R. J. Jackson, C. U. T. Hellen, et T. V. Pestova, « The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, n° 2, p. 113-127, févr. 2010, doi: 10.1038/nrm2838.
- [57] E. Connolly, S. Braunstein, S. Formenti, et R. J. Schneider, « Hypoxia Inhibits Protein Synthesis through a 4E-BP1 and Elongation Factor 2 Kinase Pathway Controlled by mTOR and Uncoupled in Breast Cancer Cells », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, n° 10, p. 3955-3965, mai 2006, doi: 10.1128/MCB.26.10.3955-3965.2006.
- [58] V. Panwar *et al.*, « Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease », *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 8, n° 1, p. 1-25, oct. 2023, doi: 10.1038/s41392-023-01608-z.
- [59] « Eukaryotic initiation factors eIF4F and eIF4B promote translation termination upon closed-loop formation | Nucleic Acids Research | Oxford Academic ». [En ligne]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/nar/article/53/5/gkaf161/8069168>
- [60] Y. Guan *et al.*, « Multiple functions of stress granules in viral infection at a glance », *Front. Microbiol.*, vol. 14, p. 1138864, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1138864.

- [61] « Ribonucleoprotein Granules: Between Stress and Transposable Elements ». Consulté le: 2 juin 2025. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/2218-273X/13/7/1027>
- [62] V. N. Uversky, « Biological Liquid–Liquid Phase Separation, Biomolecular Condensates, and Membraneless Organelles: Now You See Me, Now You Don’t », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, n° 17, p. 13150, août 2023, doi: 10.3390/ijms241713150.
- [63] H. Zhang *et al.*, « Liquid-liquid phase separation in biology: mechanisms, physiological functions and human diseases », *Sci. China Life Sci.*, vol. 63, n° 7, p. 953-985, juill. 2020, doi: 10.1007/s11427-020-1702-x.
- [64] D. Dolicka, M. Foti, et C. Sobolewski, « The Emerging Role of Stress Granules in Hepatocellular Carcinoma », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n° 17, p. 9428, août 2021, doi: 10.3390/ijms22179428.
- [65] B. Wolozin et P. Ivanov, « Stress granules and neurodegeneration », *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 20, n° 11, p. 649-666, nov. 2019, doi: 10.1038/s41583-019-0222-5.
- [66] J. Wang, Y. Gan, J. Cao, X. Dong, et W. Ouyang, « Pathophysiology of stress granules: An emerging link to diseases (Review) », *Int. J. Mol. Med.*, vol. 49, n° 4, p. 44, avr. 2022, doi: 10.3892/ijmm.2022.5099.
- [67] M. R. Asadi *et al.*, « Stress Granules and Neurodegenerative Disorders: A Scoping Review », *Front. Aging Neurosci.*, vol. 13, p. 650740, juin 2021, doi: 10.3389/fnagi.2021.650740.
- [68] A. Marcelo, R. Koppenol, L. P. de Almeida, C. A. Matos, et C. Nóbrega, « Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? », *Cell Death Dis.*, vol. 12, n° 6, p. 592, juin 2021, doi: 10.1038/s41419-021-03873-8.
- [69] D. Mateju et J. A. Chao, « Stress granules: regulators or by-products? », *FEBS J.*, vol. 289, n° 2, p. 363-373, 2022, doi: 10.1111/febs.15821.
- [70] M. J. Brownsword et N. Locker, « A little less aggregation a little more replication: Viral manipulation of stress granules », *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 14, n° 1, p. e1741, 2023, doi: 10.1002/wrna.1741.
- [71] J. P. White et R. E. Lloyd, « Regulation of stress granules in virus systems », *Trends Microbiol.*, vol. 20, n° 4, p. 175-183, avr. 2012, doi: 10.1016/j.tim.2012.02.001.
- [72] R. E. Lloyd, « Regulation of stress granules and P-bodies during RNA virus infection », *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 4, n° 3, p. 317-331, 2013, doi: 10.1002/wrna.1162.
- [73] C. Aloise, J. G. Schipper, R. J. de Groot, et F. J. van Kuppeveld, « Move and countermove: the integrated stress response in picorna- and coronavirus-infected cells », *Curr.*

Opin. Immunol., vol. 79, p. 102254, déc. 2022, doi: 10.1016/j.coi.2022.102254.

- [74] H. Montero et V. Trujillo-Alonso, « Stress Granules in the Viral Replication Cycle », *Viruses*, vol. 3, n° 11, p. 2328-2338, nov. 2011, doi: 10.3390/v3112328.
- [75] E. V. Nelson *et al.*, « Ebola Virus Does Not Induce Stress Granule Formation during Infection and Sequesters Stress Granule Proteins within Viral Inclusions », *J. Virol.*, vol. 90, n° 16, p. 7268-7284, août 2016, doi: 10.1128/JVI.00459-16.
- [76] S. Xu *et al.*, « Pseudorabies virus infection inhibits stress granules formation via dephosphorylating eIF2 α », *Vet. Microbiol.*, vol. 247, p. 108786, août 2020, doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108786.
- [77] H. M. Burgess et I. Mohr, « Defining the Role of Stress Granules in Innate Immune Suppression by the Herpes Simplex Virus 1 Endoribonuclease VHS », *J. Virol.*, vol. 92, n° 15, p. e00829-18, juill. 2018, doi: 10.1128/JVI.00829-18.
- [78] R. L. Finnen et B. W. Banfield, « Alphaherpesvirus Subversion of Stress-Induced Translational Arrest », *Viruses*, vol. 8, n° 3, p. 81, mars 2016, doi: 10.3390/v8030081.
- [79] H. Sato, L. D. Callanan, L. Pesnicak, T. Krogmann, et J. I. Cohen, « Varicella-Zoster Virus (VZV) ORF17 Protein Induces RNA Cleavage and Is Critical for Replication of VZV at 37°C but Not 33°C », *J. Virol.*, vol. 76, n° 21, p. 11012-11023, nov. 2002, doi: 10.1128/JVI.76.21.11012-11023.2002.
- [80] L. Eke, A. Tweedie, S. Cutts, E. L. Wise, et G. Elliott, « Translational arrest and mRNA decay are independent activities of alphaherpesvirus virion host shutoff proteins », *J. Gen. Virol.*, vol. 105, n° 4, p. 001976, avr. 2024, doi: 10.1099/jgv.0.001976.
- [81] R. Zhao *et al.*, « Pseudorabies virus IE180 protein hijacks G3BPs into the nucleus to inhibit stress granule formation », *J. Virol.*, vol. 99, n° 4, p. e02088-24, doi: 10.1128/jvi.02088-24.
- [82] T. Lenac Roviš *et al.*, « Comprehensive Analysis of Varicella-Zoster Virus Proteins Using a New Monoclonal Antibody Collection », *J. Virol.*, vol. 87, n° 12, p. 6943-6954, juin 2013, doi: 10.1128/jvi.00407-13.
- [83] T. Koshizuka, T. Sadaoka, H. Yoshii, K. Yamanishi, et Y. Mori, « Varicella-zoster virus ORF1 gene product is a tail-anchored membrane protein localized to plasma membrane and trans-Golgi network in infected cells », *Virology*, vol. 377, n° 2, p. 289-295, août 2008, doi: 10.1016/j.virol.2008.04.039.
- [84] M. I. Khalil, M. Sommer, A. Arvin, J. Hay, et W. T. Ruyechan, « Regulation of the Varicella-zoster Virus ORF3 Promoter by Cellular and Viral Factors », *Virology*, vol. 440, n° 2, p. 171-181, juin 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.02.019.

- [85] M. G. Lloyd *et al.*, « Development of Robust Varicella Zoster Virus Luciferase Reporter Viruses for In Vivo Monitoring of Virus Growth and Its Antiviral Inhibition in Culture, Skin, and Humanized Mice », *Viruses*, vol. 14, n° 4, p. 826, avr. 2022, doi: 10.3390/v14040826.
- [86] A.-K. Brunnemann *et al.*, « Drug Resistance of Clinical Varicella-Zoster Virus Strains Confirmed by Recombinant Thymidine Kinase Expression and by Targeted Resistance Mutagenesis of a Cloned Wild-Type Isolate », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, n° 5, p. 2726-2734, mai 2015, doi: 10.1128/AAC.05115-14.
- [87] H. Yoshii *et al.*, « Varicella-zoster virus ORF 58 gene is dispensable for viral replication in cell culture », *Virol. J.*, vol. 5, p. 54, avr. 2008, doi: 10.1186/1743-422X-5-54.
- [88] S. M. Reddy, M. Williams, et J. I. Cohen, « Expression of a uracil DNA glycosylase (UNG) inhibitor in mammalian cells: varicella-zoster virus can replicate in vitro in the absence of detectable UNG activity », *Virology*, vol. 251, n° 2, p. 393-401, nov. 1998, doi: 10.1006/viro.1998.9428.
- [89] « US9, a stable lysine-less herpes simplex virus 1 protein, is ubiquitinated before packaging into virions and associates with proteasomes | PNAS ». Consulté le: 19 août 2025. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.94.25.13973>
- [90] K. K. Biron, « Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases », *Antiviral Res.*, vol. 71, n° 2, p. 154-163, sept. 2006, doi: 10.1016/j.antiviral.2006.05.002.
- [91] M. Ma, W. Jiang, et R. Zhou, « DAMPs and DAMP-sensing receptors in inflammation and diseases », *Immunity*, vol. 57, n° 4, p. 752-771, avr. 2024, doi: 10.1016/j.jimmuni.2024.03.002.
- [92] A. R. Fehr, « Bacterial Artificial Chromosome-Based Lambda Red Recombination with the I-SceI Homing Endonuclease for Genetic Alteration of MERS-CoV », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 2099, p. 53-68, 2020, doi: 10.1007/978-1-0716-0211-9_5.