



HAL
open science

Etude structurale et fonctionnelle de la glycoprotéine des Rhabdovirus

Laura Belot

► **To cite this version:**

Laura Belot. Etude structurale et fonctionnelle de la glycoprotéine des Rhabdovirus. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS522 . tel-02614615

HAL Id: tel-02614615

<https://theses.hal.science/tel-02614615>

Submitted on 21 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Etude structurale et fonctionnelle de la glycoprotéine des Rhabdovirus

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°577 :
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Gif-Sur-Yvette, le 16 décembre 2019, par

Laura BELOT

Composition du Jury :

Mr Denis GERLIER
Directeur de Recherche, Centre international de Recherche en Infectiologie (CIRI)
(UMR 5308)
Rapporteur

Mr Pierre-Yves Lozach
Directeur de Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)
(UMR 754)
Rapporteur

Mme Marie-Christine Vaney
Chargée de Recherche, Institut Pasteur (Unité de Virologie structurale)
Examinatrice

Mr Philippe Minard
Professeur, Institut de biologie Intégrative de la cellule (I2BC) (Département
Biochimie, Biophysique et Biologie Structurale)
Président du jury

Mr Yves Gaudin
Directeur de Recherche, Institut de biologie Intégrative de la cellule (I2BC)
(CNRS-UMR 9198)
Directeur de thèse

Mme Aurélie Albertini
Chargée de Recherche, Institut de biologie Intégrative de la cellule (I2BC)
(CNRS-UMR 9198)
Co-Directrice de thèse

Remerciements

En premier lieu je souhaite remercier mon co-directeur de thèse Yves Gaudin pour m'avoir accueillie dans son département et plus particulièrement dans l'équipe Rhabdovirus. Je le remercie pour l'expérience enrichissante, et pleine d'intérêt, qu'il m'a fait vivre durant ces années. Il m'a fait découvrir le monde de la recherche et m'en a fait une vocation. Je lui suis extrêmement reconnaissante d'avoir toujours été à l'écoute, bienveillant, compréhensif et généreux de conseils avisés ainsi que pour la pertinence de ses critiques.

Je souhaite témoigner à Aurélie Albertini, ma co-directrice de thèse, toute ma gratitude pour sa patience, la grande confiance qu'elle m'a accordée, et le savoir-faire qu'elle m'a transmis. Travailler à ses côtés m'a permis cette émulation scientifique quotidienne qui a été l'un des piliers de ma motivation depuis mon premier stage dans cette équipe, durant ma première année de Master. Aurélie m'a accompagnée durant mes deux stages de Master, puis pour ces 3 années de thèse. Au fur et à mesure, nous avons développé une connivence qui m'a été très précieuse et pour laquelle je la remercie chaleureusement.

Je tiens également à remercier une nouvelle fois, et conjointement, mes deux co-directeurs de thèse Aurélie Albertini et Yves Gaudin, pour le temps qu'ils ont consacré à la relecture de mon manuscrit de thèse.

Je remercie (non sans une certaine émotion) l'ensemble des personnes de cette équipe, sans qui cette expérience n'aurait pas été aussi épanouissante.

Je remercie vivement Hélène Raux, pour l'intérêt qu'elle a porté à mes travaux tout au long de ma thèse, ainsi que pour les précieux conseils techniques et généraux, qu'elle a su partager avec moi.

De la même façon je remercie Danielle Blondel pour les nombreuses réponses qu'elle a su m'apporter, et pas seulement aux questions relatives à la thèse ou au futur post-doctorat.

Je remercie Cécile Lagaudrière-Gesbert qui m'a fait découvrir l'équipe et sans qui je n'aurais pas vécu cette expérience.

Je remercie Nathalie Scrima pour son encadrement lors de mes premiers clonages et sa grande disponibilité tout le long de ma thèse.

Je remercie Ahmet pour sa gentillesse.

Je remercie Christine Maheu pour la quantité de virus qu'elle m'a fournie, en plus de sa bonne humeur.

Tous ont su m'intégrer, avec gentillesse et jovialité, y compris les anciens que je n'oublie pas, qui étaient là avant que l'aventure de ma thèse ne commence: Nolwenn Poccardi, Julie Takissian, Zoé Lama. Je remercie également avec nostalgie Jovan Nikolic pour sa bienveillance, sa grande gentillesse, son soutien et les chasses aux Ferrero. Je remercie Abbas Abou Hamdam et je remercie chaleureusement Alice Decombe pour le soleil qu'elle a su m'apporter durant ses 6 mois de stage au sein de ce laboratoire.

Je remercie également très chaleureusement Malika Ould Ali pour sa sympathie, son écoute, et pour m'avoir formée à la microscopie électronique. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordée sur les appareils, ainsi que pour le temps qu'elle a consacré à regarder nos petits objets en cryo-microscopie électronique.

En somme, je remercie l'ensemble de l'équipe pour l'accueil chaleureux et professionnel qu'elle m'a réservé et la contribution de chacun à la réalisation de ma thèse dans les meilleures conditions. Je remercie également les autres membres du département de

Virologie et Interactions Hôtes-Pathogènes de l'I2BC, notamment Paulo Tavares, Audrey Labarde, Isabelle Auzat, Sandrine Brasiles, Jack Dorling avec qui j'ai beaucoup interagité. J'ai une pensée particulière pour Stéphane Roche pour les très nombreuses discussions que l'on a eues autour des cristaux que j'ai obtenus, pour ses encouragements et sa bonne humeur perpétuelle.

Je vous remercie tous, très sincèrement, de m'avoir permis de profiter pleinement de cette expérience enrichissante. Tant au plan professionnel que personnel.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, les Dr. Denis Gerlier et Pierre-Yves Lozach d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que le Dr. Marie-Christine Vaney et le Pr. Philippe Minard qui ont accepté d'en être les examinateurs. Je profite de ces remerciements pour en adresser un particulier au Pr. Philippe Minard, l'enseignant qui a éveillé en moi l'attrait pour la biochimie et qui m'a amenée à suivre le Master dont il est co-responsable.

Je remercie mes tuteurs Bernard Delmas et Julie Ménétrety pour leur accompagnement durant ma thèse ainsi que leur très grande gentillesse.

Je voudrais remercier également :

Magali Aumont-Nicaise, pour les mesures d'ITC mais surtout pour sa patience et sa grande amabilité ; Christophe Velours, pour l'UCA et le SEC-MALS, toujours réalisés avec le sourire ; Stéphane Plancqueel pour les cribles de cristallogenèse, les fous rires et surtout sa très grande disponibilité.

Pierre Legrand, avec qui nous collaborons, pour sa disponibilité et le savoir-faire qu'il a su partager avec gentillesse et pédagogie ainsi que l'aide qu'il nous a apportée.

Enfin je souhaiterais remercier affectueusement les personnes sans qui je ne pourrais pas être celle que je suis, qui m'ont soutenue sans relâche, et ont également rendu possible cette thèse. Je commencerai de toute évidence par mon père et ma mère, qui ont toujours cru en moi et m'ont fait confiance. Je remercie ma famille et mes amis. Je remercie Maëlle, de m'avoir tant exprimé sa fierté. Je terminerai en témoignant mon affection à François qui m'a accompagnée tout au long de cette expérience et surtout de m'avoir soutenu pour les derniers moments de cette thèse.

A mon père, et à Gouget.

Table des matières

Remerciements	1
Table des figures.....	8
Liste des abréviations.....	10
INTRODUCTION.....	11
1. Introduction générale	11
1.1. La famille des Rhabdoviridae.....	11
1.2. Le VSV.....	12
1.2.1. Etiologie de la stomatite vésiculeuse	12
1.2.2. Physiopathologie de la stomatite vésiculeuse.....	13
1.3. Le virus de la rage.....	14
1.3.1. Étiologie de la rage.....	14
1.3.2. Physiopathologie de la rage.....	15
1.3.3. Traitement.....	15
1.4. Structure de la particule virale des Rhabdovirus.....	16
1.5. Le cycle viral	17
1.5.1. Entrée virale	17
1.5.2. Synthèse des composants viraux de VSV et de RABV	18
1.5.2.a. La transcription virale.....	18
1.5.2.b. La traduction des messagers viraux.....	19
1.5.2.c. La réplication virale.....	19
1.5.3. Assemblages et bourgeonnement	20
1.6. Les protéines virales et leur implication dans l'infection	22
1.6.3. La ribonucléoprotéine	22
1.6.3.a. La nucléoprotéine	22
1.6.3.b. La phosphoprotéine.....	24
1.6.3.c. L'ARN polymérase ARN-dépendante.....	26
1.6.4. Les protéines associées à l'enveloppe virale.....	28
1.6.4.a. La protéine de matrice	28
2. La glycoprotéine et l'entrée des Rhabdovirus	31
2.1. Généralités sur G.....	31
2.2. Structure de la glycoprotéine des vésiculovirus.....	32
2.3. Attachement et récepteurs.....	34
2.3.1. Les facteurs d'attachement.....	35
2.3.2. Les récepteurs.....	35
2.3.2.a. Les récepteurs du VSV	35

(i) Le récepteur des LDL et les membres de sa famille	35
(ii) D'autres récepteurs pour VSV ?	36
2.3.2.b. Les récepteurs de RABV	37
(i) Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine.....	37
(ii) La molécule d'adhésion des cellules neuronales.....	38
(iii) Le récepteur murin du facteur de croissance nerveux de faible affinité	38
(iv) Le récepteur métabotrope du glutamate 2	39
2.3.2.c. Les récepteurs d'autres Rhabdovirus.....	39
2.4. Voie d'entrée des Rhabdovirus dans la cellule-hôte	40
2.4.1. Entrée par endocytose médiée par la clathrine	40
2.4.2. Entrée dépendante de l'actine	40
2.4.3. Le transport des Rhabdovirus après internalisation	41
2.4.3.a. Le transport du VSV dans la voie endosomale.....	41
2.4.3.b. Le transport de RABV dans l'axone.....	42
2.5. La fusion membranaire	44
2.5.1. Considérations générales	44
2.5.2. Propriétés de fusion des Rhabdovirus	46
2.5.3. Les différentes classes de protéines de fusion virales.....	46
2.5.3.a. Les protéines de fusion de classe I	47
(i) Influenza HA, le prototype des glycoprotéines de fusion de classe I.....	47
(ii) Caractéristiques communes aux protéines de fusion de classe I.....	48
2.5.3.b. Les protéines de fusion de classe II	49
(i) TBEV E, le prototype des glycoprotéines de fusion de classe II.....	49
(ii) Caractéristiques communes aux protéines de fusion de classe II	50
2.5.3.c. Les protéines de fusion de classe III	51
(i) VSV G, le prototype des glycoprotéines de fusion de classe III	51
(ii) Caractéristiques communes aux protéines de fusion de classe III.....	51
2.5.4. Mécanisme de la fusion membranaire induite par les Rhabdovirus	52
2.5.4.a. Une coopérativité nécessaire	52
2.5.4.b. Piégeage d'intermédiaires durant le processus de fusion	52
2.5.4.c. Fonctionnement de la machinerie de fusion des Rhabdovirus	53
(i) Interaction des boucles de fusion avec la membrane cible	53
(ii) Interrupteurs sensibles au pH.....	53
(iii) Intermédiaires structuraux durant la transition structurale de G.....	54
3. Antigénicité des Rhabdovirus	58
3.1. Anticorps et réponse immunitaire.....	58
3.2. Les sites antigéniques	58

3.2.1. Méthodes d'étude des épitopes et des sites antigéniques	58
3.2.1.a. Les anticorps utilisés	58
3.2.1.b. Le modèle d'étude viral	58
(i) Sélection de mutants d'échappement	58
(ii) Utilisation de mutants de délétion, de chimères ou bien pontuels	59
(iii) Alignement de séquences.....	59
(iv) Génération de fragments chevauchants	59
3.2.2. Les sites antigéniques de RABV G	59
3.2.3. Les sites antigéniques de VSV G	62
3.2.5. Les anticorps et les traitements alternatifs de la rage	62
4. Les objectifs de la thèse.....	65
4.1. Les bases moléculaires de l'interaction entre VSV G et son récepteur	65
4.2. L'antigénicité de VSV G.....	65
4.3. Structure de la G de Lyssavirus	65
MATERIEL ET METHODES.....	67
1. Biologie moléculaire	67
1.1. Souches bactériennes.....	67
1.2. Milieux de cultures bactériens.....	67
1.3. Clonage	67
2. Biologie cellulaire	68
2.1. Souches cellulaires	68
2.2. Virus et souches	69
2.3. Infection des cellules	69
2.4. Production et purification de virus.....	69
2.5. Neutralisation de l'infection virale par les Fab	70
2.6. Interaction entre VSV G et les Fab.....	70
3. Biochimie	70
3.1. Production et purification des protéines	70
3.2. SEC MALS.....	73
4. Biologie structurale	73
4.1. Cristallogénèse.....	73
4.2. Microscopie et cryo-EM.....	73
4.2.1. Microscopie électronique en coloration négative de VSV ou de différentes G	73
4.2.2. Cryo-EM de VSV Gth-Fab et GPV _{fl}	74
RESULTATS	77
1. Les bases moléculaires de l'interaction entre VSV G et son récepteur	77
1.1. Introduction.....	77

1.2. Résultats.....	77
1.3. Conclusion	95
2. Caractérisation structurale de la glycoprotéine de VSV en complexe avec un anticorps neutralisant.....	96
2.1. Contexte.....	96
2.2. Objectifs.....	96
2.3. Résultats.....	97
2.3.1. Neutralisation de l'infection virale par le Fab	97
2.3.2. Etude de l'interaction entre VSV G et le Fab.....	97
2.3.2.a. Interaction entre G _{th} et le Fab 8G5F11	97
2.3.2.b. Interaction entre VSV G et le Fab 8G5F11, à la surface des particules virales .	98
2.3.3. Isolation et caractérisation du complexe G/Fab.....	99
2.3.4. Etude structurales du complexe G _{th} -Fab.....	101
2.3.4.a. Cristallisation du complexe G _{th} -Fab	101
2.3.4.b. Etude du complexe G _{th} -Fab par microscopie électronique.....	103
2.3.4.c. Etude du complexe G _{th} -Fab par cryo-EM	105
2.4. Conclusion	106
3. Structure de la G des Lyssavirus	107
3.1. Contexte.....	107
3.2. Objectifs.....	108
3.3. Résultats.....	108
3.3.1. Etude de l'ectodomaine de GPV.....	108
3.3.1.a. Obtention de l'ectodomaine soluble de GPV.....	108
3.3.1.b. Etude structurale de l'ectodomaine de GPV.....	109
(i) Cristallogénèse de l'ectodomaine de GPV.....	109
(ii) Observation par microscopie électronique de l'ectodomaine de GPV.....	109
3.3.2. Etude de la forme complète de GPV	110
3.3.2.a. Obtention de la forme entière de GPV à partir des particules virales	110
3.3.2.b. Etude structurale de GPV _{fl}	111
(i) Observation par microscopie électronique de GPV _{fl}	111
3.3.3. Etude structurale de l'ectodomaine de la glycoprotéine d'autres Lyssavirus	112
3.3.3.a. Obtention des ectodomains des glycoprotéines des virus MOK et WBC	113
3.3.3.b. Etude structurale la glycoprotéine des virus MOK et WCB	113
(i) Cristallogénèse de l'ectodomaine de GMOK.....	113
(ii) Etude par microscopie électronique de l'ectodomaine de GMOK	114
(iii) Etude par microscopie électronique de l'ectodomaine de GWCBm	115
3.4. Conclusion	116

DISCUSSION.....	117
1. Bases moléculaires de l'interaction entre VSV G et son récepteur.....	117
1.1. Les récepteurs du VSV	117
1.2. VSV G, un outil en biotechnologie.....	118
2. Caractérisation structurale de VSV G en complexe avec un anticorps neutralisant.....	119
2.1. Caractérisation de l'interaction entre VSV G et le Fab 8G5F11	119
2.2. Mécanisme de neutralisation des Fab	121
2.3. Structure du complexe G-Fab 8G5F11	121
3. Structure de la G des Lyssavirus.....	121
3.1. L'étude de l'ectodomaine de G des Lyssavirus	122
3.2. L'étude de la forme complète de GPV	122
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123
ANNEXES	141
Images de microscopie électronique.....	141
Contribution personnelle aux travaux publiés.....	148

Table des figures

Figure 1. Arbre Phylogénétique de l'ordre des Mononegavirales.....	11
Figure 2 : Distribution mondiale de la stomatite vésiculeuse et troubles physiques induits par l'infection.....	13
Figure 3. Distribution du risque d'être en contact avec le virus de la rage en 2013	14
Figure 4. Cliché de Rhabdovirus par EM après coloration négative.....	16
Figure 5. Organisation de la particule virale et génome des Rhabdovirus.	17
Figure 6. Cycle viral des Rhabdovirus.....	17
Figure 7.Schéma du génome viral.....	18
Figure 8. Schéma de la réplication et transcription virale	19
Figure 9.Schéma de la transcription et de la réplication du virus de la rage.....	20
Figure 10.Modèle d'assemblage et de bourgeonnement des Rhabdovirus.....	21
Figure 11. Structure de la N de RABV.....	23
Figure 12. La phosphoprotéine des Rhabdovirus.....	26
Figure 13. Structure de la polymérase de VSV.....	27
Figure 14. Structure de la protéine de matrice de VSV.....	29
Figure 15. Structures de la glycoprotéine de VSV et de CHAV.....	33
Figure 16. Cycle du LDL Récepteur dans l'homéostasie du cholestérol.....	36
Figure 17. Structure cristallographique de la forme endosomale du LDLR et schéma du LDLR sous sa forme endosomale à pH acide et extracellulaire à pH neutre.	37
Figure 18. Les récepteurs proposés pour RABV.....	37
Figure 19. Voies proposées pour l'entrée du VSV dans la cellule hôte.....	42
Figure 20.Mécanisme proposé pour l'entrée de RABV et son transport rétrograde dans les neurones.....	44
Figure 21. Schéma du processus de fusion membranaire par l'intermédiaire d'un intermédiaire hémifusion.....	45
Figure 22. Protéines de fusion de classe I.....	48
Figure 23. Protéines de fusion de classe II.....	50
Figure 24. Les éléments interrupteurs sensibles au pH.....	54
Figure 25.Structure de la G de CHAV dans l'unité asymétrique du cristal.....	55
Figure 26.Voie plausible du changement de conformation des Vésiculovirus G.....	56
Figure 27. Dimère de G de CHAV.....	57
Figure 28. Sites antigéniques de RABV G.....	61
Figure 29. Sites antigéniques de VSV G.....	63
Figure 30. Différences structurales entre les G de VSV et CHAV sous conformation post-fusion.....	64
Figure 31. Les domaines CR du LDLR.....	76
Figure 32. Arbre phylogénétique des Vésiculovirus.....	96

Figure 33. Courbe de neutralisation de l'infection de VSV par les Fab.....	97
Figure 34. Interaction des Fab avec G _{th} en solution et à la surface des particules virales.....	98
Figure 35. Morphologie de G à la surface des particules virales à pH 8 et à pH 6, en absence et en présence des Fab 8G5F11.	100
Figure 36. Purification de G _{th} , des Fab 8G5F11 et du complexe G _{th} -Fab 8G5F11	102
Figure 37. Galerie des cristaux du complexe G _{th} -Fab.....	103
Figure 38. Morphologie de G _{th} en solution à pH 8 et à pH 6, en absence et en présence des Fab 8G5F11, visualisés par microscopie électronique en coloration négative.....	104
Figure 39. Observations de G _{th} à pH 6, en absence et en présence des Fab, par cryo-EM.	106
Figure 40. Arbre phylogénétiques des Lyssavirus.	107
Figure 41. Purification de GPV440m.	108
Figure 42. Galerie des cristaux de GPV440m-streptag.....	109
Figure 43. Morphologie de GPV440m en coloration négative à pH 8 et pH 6.	110
Figure 44. Purification de GPV _f	111
Figure 45. Morphologie de GPV _f à pH 6, après coloration négative à l'acétate d'uranyle.	111
Figure 46. Images de cryo-EM de GPV _f en présence de détergent à pH 6.	112
Figure 47. Purification de GMOKm et GWCBm.....	113
Figure 48. Galerie des cristaux de GMOKm-streptag.....	114
Figure 49. Morphologie de GMOKm et GMOKwt à pH 6.....	114
Figure 50. Morphologie de GWCBm à pH 8 et à pH 6 en microscopie électronique.	115
Figure 51. Interaction HRV2VP1-V3, VSV G-CR2 et VSV G-CR3.....	118
Figure 52. Schéma illustrant le ciblage de cellules d'intérêt avec VSV Gnano*.....	119
Figure 53. Localisation de l'épitope reconnu par l'anticorps 8G5F11.....	120
Figure 54. Variation de l'épaisseur de la couche de G à la surface des particules virales en présence des Fab.	120

Liste des abréviations

ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
BEFV	Le virus de la fièvre éphémère bovine
CHAV	Virus Chandipura
CMC	Concentration micellaire critique
CME	Endocytose médiée par la clathrine
CN	Corps de Negri
DAG	Diacylglycérol
DNTS	Segment N-terminal désordonné
DUVV	Virus Duvenhage
ESCRT	Complexe de sortie endosomale requis pour le transport
Fab	Fragment de liaison à l'antigène
FC	Fragment cristallin
G	Glycoprotéine
GPV	Glycoprotéine du virus de la rage souche PV
GNS	Glycoprotéine non structurale
ILV	Vésicule intraluminale
HA	Hemmaglutinine du virus de la grippe
IRF	Facteur régulateur de l'interféron
kDa	kiloDalton
L	ARN polymérase ARN-dépendant
LPC	Lysophosphatidylcholine
M	Protéine de Matrice
MOKV	Virus Mokola
MVB	Corps multivésiculaires
N	Nucléoprotéine
NC	Nucléocapside
NES	Signal d'export nucléaire
P	Phosphoprotéine
PC	Phosphatidylcholine ou tampon phosphate-citrate
PE	Phosphatidyléthanolamine
PKC	Protéine kinase C
PML	Protéine de leucémie promyélocytaire
PS	Phosphatidylsérine
PV	Virus de la rage souche Pasteur Virus
RABV	Virus de la rage
RNP	Ribonucléoprotéine
Rpm	Rotation par minute
RVPK	Phosphoprotéine kinase du virus de la rage
SFV	Virus de la forêt de Semliki
SNC	Système nerveux central
STAT 1	Le transducteur de signal et l'activateur de transcription 1
VHSV	Virus de la septicémie hémorragique virale
VSV	Virus de la stomatite vésiculeuse
WCBV	Virus de la chauve-souris ouest africaine

1. Introduction générale

1.1. La famille des Rhabdoviridae

La famille des Rhabdoviridae appartient à l'ordre des Mononegavirales, et contient 18 genres différents et une espèce non attribuée (Virus Moussa) (Walker et al., 2018).

Les Rhabdovirus sont répandus parmi une grande diversité d'organismes. On les retrouve chez les vertébrés (mammifères, oiseaux, reptiles, poissons), les invertébrés (insectes, arachnides, crustacés) et les plantes (Figure 1 et Tableau 1). Plusieurs membres des Rhabdoviridae sont associés à des pathologies importantes chez l'homme et le bétail (Dietzgen et al., 2017).

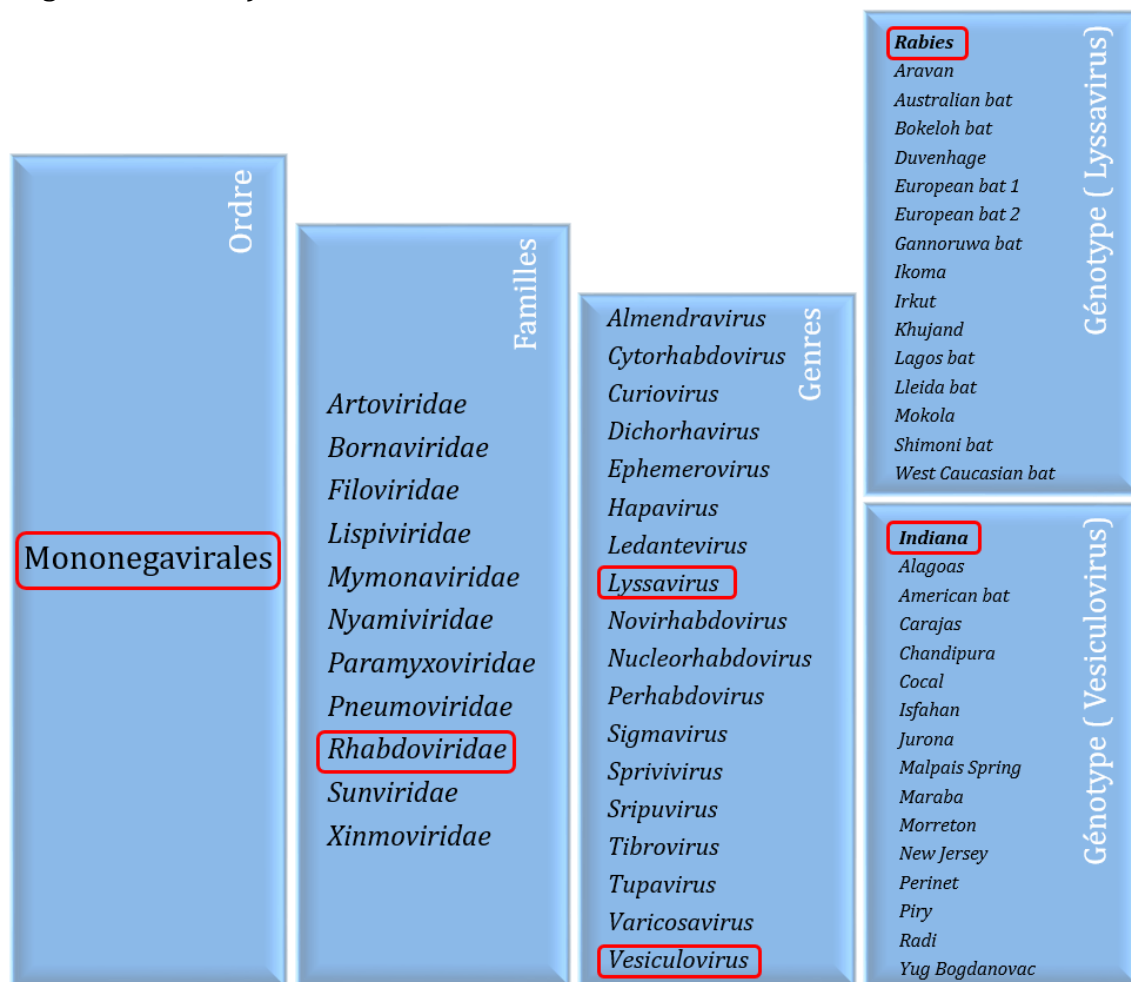


Figure 1. Taxonomie de l'ordre des Mononegavirales.

Les génotypes indiqués en gras correspondent au prototype de chaque famille virale. Les encarts rouges indiquent la phylogénie des souches virales étudiées durant la thèse.

Les deux genres les plus étudiés chez les Rhabdovirus sont le genre Lyssavirus, dont le prototype est le virus de la rage (RABV) et le genre Vésiculovirus, pour qui le prototype est le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV). Les Lyssavirus n'infectent que les mammifères chez qui ils causent des encéphalites mortelles. Ce genre est subdivisé en 3 phylogroupes différents, basés essentiellement sur la distance génétique et l'antigénicité de chaque groupe d'isolat.

Genre	Hôte
Almendravirus	Les moustiques
Cytorhabdovirus	Les plantes et les insectes vecteurs
Curiovirus	Les moustiques, les moucheron et phlébotomes, vertébrés*
Dichorhavirus	Les plantes
Ephemerovirus	Le bétail* et les moustiques
Hapavirus	Les moustiques, les moucheron, les lézards, les oiseaux* et les mammifères*
Ledantavirus	Les moustiques, les tiques, les puces, les mammifères* dont l'Homme*
Lyssavirus	Les mammifères dont l'Homme
Novirhabdovirus	Les poissons
Nucleorhabdovirus	Les plantes et les sauterelles
Perhabdovirus	Les poissons
Sigmavirus	Les drosophiles
Sprivivirus	Les poissons*
Spipuvirus	Les moucheron, les lézards
Tibrovirus	Le bétail*, les buffles*
Tupavirus	Les oiseaux
Varicosavirus	Les plantes
Vesiculovirus	L'humain, le bétail*, les moucheron et les mouches noires

*sont transmis par les arthropodes

Tableau 1. Tableau représentant les différents genres de la famille Rhabdoviridae et leurs hôtes respectifs.

1.2. Le VSV

1.2.1. Etiologie de la stomatite vésiculeuse

Le VSV est un Vésiculovirus responsable de la stomatite vésiculeuse. Cette maladie n'est pas une maladie émergente puisque des cas datant du début des années 1800 ont été répertoriés aux Etats-Unis (Hanson, 1952). Cette maladie s'est fait connaître plus tard lorsqu'elle a handicapé 4000 chevaux durant la Guerre civile américaine en 1862.

La stomatite vésiculeuse est endémique dans certaines régions au Sud du Mexique, en Amérique centrale, au Venezuela, en Colombie, en Equateur et au Pérou. Des foyers ont été rapportés au Nord du Mexique et dans l'Ouest des Etats-Unis, notamment en 2014 au Texas et au Colorado. Des cas sporadiques ont été rapportés en Argentine et au Brésil également. La contagion hors de ces pays a ensuite été causée lors de l'envoi de chevaux contaminés depuis les Etats-Unis vers l'Afrique du Sud (à partir des années 1880) puis en Europe au cours de la première Guerre Mondiale, elle a historiquement été décrite en France en 1915 et 1917. Aujourd'hui, elle est principalement confinée au continent américain (Figure 2,A).



Figure 2 : Distribution mondiale de la stomatite vésiculeuse et troubles physiques induits par l'infection.

A. La carte (Kumar et al, 2018) montre l'incidence mondiale de la maladie, les pays comportant des preuves sérologiques et récurrentes d'une infection sont représentés en rouge. **B.** Présence de vésicules sur la langue, les babines et les sabots d'un cheval, due à une infection par le VSV.

1.2.2. Physiopathologie de la stomatite vésiculeuse

Chez les bovins, les chevaux et les porcs, la stomatite vésiculeuse est caractérisée par une apparition de vésicules sur la langue, les babines, les muqueuses buccales, les sabots, les tétines et le prépuce. Ces lésions sont douloureuses et s'accompagnent de fièvre. Les animaux retrouvent leur état normal en deux à trois semaines. La maladie n'est pas facilement reconnaissable car elle ne peut être distinguée de la fièvre aphteuse sur ses signes cliniques, donc en attendant le diagnostic, les animaux sont isolés.

Bien que VSV ne soit pas mortel, il engendre un taux de morbidité élevé du fait de sa contagiosité, ce qui a des conséquences économiques puisque l'infection peut s'étendre à un élevage entier. Comme il n'y a pas de traitement, une règle européenne exige l'abattage des animaux diagnostiqués, afin de limiter la contagion, qui est toujours possible malgré l'isolement. En effet, le virus peut infecter des animaux par transmission directe par voie transcutanée et transmucoale, via la salive, et après rupture des vésicules induisant la libération du liquide vésiculaire chargé en particules virales ; mais aussi par voie indirecte par transmission vectorielle par les insectes. Cette transmission vectorielle peut se faire par un insecte piqueur, et dans ce cas le confinement d'un animal infecté ne suffit pas à éviter la transmission aux animaux sains. La transmission peut également se faire lors de l'ingestion d'insectes infectés présents dans les pâturages (Drolet et al., 2009).

La stomatite vésiculeuse est une zoonose, c'est-à-dire une maladie infectieuse des animaux vertébrés transmissible à l'être humain. L'infection humaine dans les zones endémiques apparaît de façon commune et est directement liée au contact avec les animaux contaminés. Elle peut être aussi détectée chez les travailleurs dans les laboratoires étudiant

le VSV. De fait, avant que ne soient instaurés les procédures et équipements modernes de sécurité biologique, les personnes infectées étaient des personnes manipulant des animaux infectés par le VSV ou le virus lui-même. La maladie peut apparaître 20-30 h après l'exposition, dure de 3 à 6 jours et n'est pas associée à d'autres complications que les lésions vésiculaires qui peuvent être présentes dans le pharynx, la muqueuse buccale ou la langue. VSV peut tout de même induire une immunodépression chez la personne porteuse qui peut subir des épisodes fébriles. (Letchworth et al., 1999)

1.3. Le virus de la rage

1.3.1. Étiologie de la rage

L'origine du mot rage provient du mot latin « rabere » : être fou. La rage est l'une des plus anciennes maladies, avec des cas décrits remontant à 2000 ans avant notre ère. Les personnes étaient tellement effrayées par la rage que, après avoir été mordues par un animal potentiellement enragé, beaucoup se suicidaient. Aujourd'hui, la rage est présente sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique. Les chercheurs estiment qu'environ 59 000 décès humains sont imputables à la rage chaque année, les pays les moins développés étant davantage touchés : la plupart des cas sont signalés en Afrique (entre 21 000 et 25 000) et en Asie (environ 35 000) (Broban et al., 2018; Hampson et al., 2015) (Figure 3).

Le virus de la rage a un large réservoir d'hôtes chez les mammifères parmi les ordres Carnivora (en particulier les chiens, les chats, les animaux sauvages tels que le renard, les loups, les rats laveurs, les chacals, les mouffettes, les coyotes) et Chiroptera (les chauves-souris). Dans les pays développés, les animaux domestiques ne sont responsables que d'environ 10% des cas de transmission du virus de la rage, tandis que les animaux sauvages (surtout les chauves-souris) sont responsables de la majorité des cas. Tout mammifère peut être porteur de la rage. La transmission peut se faire par la morsure d'un animal infecté, mais aussi par le contact de la salive de l'animal enragé avec une peau lésée ou des muqueuses. Les autres voies d'infection comprennent l'inhalation du virus sous forme d'aérosol, l'ingestion, la voie transplacentaire et même la transplantation d'organes (Lu et al., 2018).

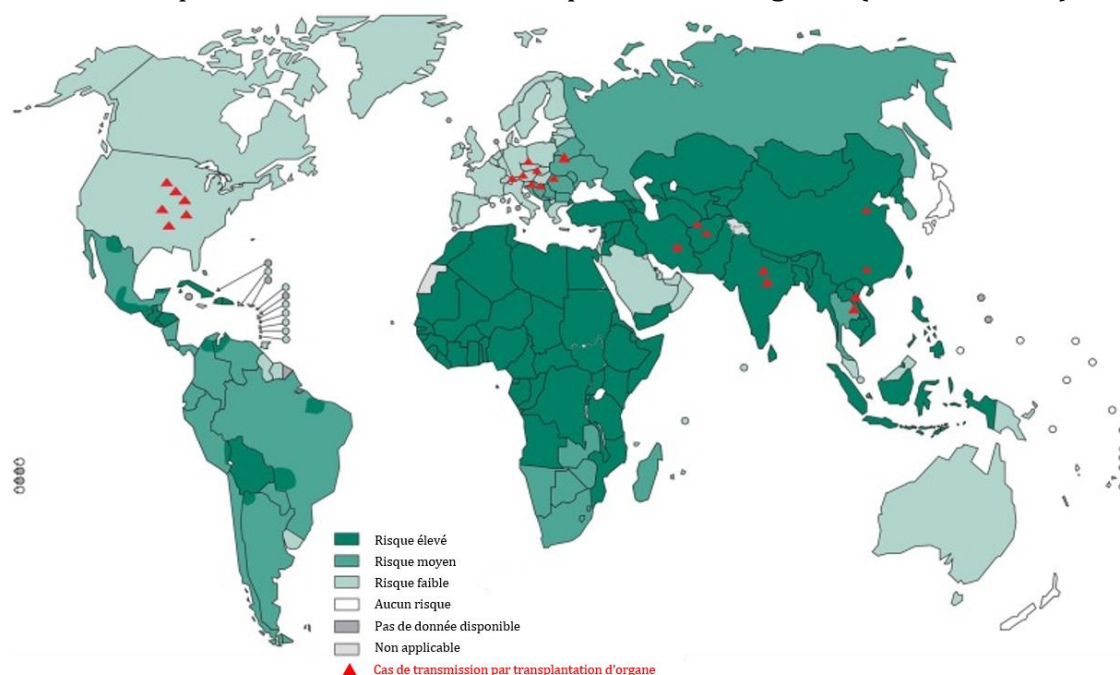


Figure 3. Distribution du risque d'être en contact avec le virus de la rage en 2013 (source OMS).

1.3.2. Physiopathologie de la rage

La rage est une zoonose généralement transmise à l'homme par morsure d'un animal infecté. Dans un premier temps, le virus reste localisé au niveau du site d'infection (Murphy and Bauer, 1974), il se multiplie au niveau des tissus périphériques et des tissus musculaires. Ce myotropisme précoce rend le traitement post-exposition possible. Le virus se déplace ensuite dans le système nerveux périphérique pour finalement envahir le système nerveux central. Au sein des neurones, le virus se déplace de façon rétrograde avec une vitesse de déplacement d'environ 3 mm/h (Tsiang, 1979) et dépend pour cela des microtubules. Le virus retourne ensuite au système nerveux périphérique, en particulier dans les zones très innervées, comme par exemple les glandes salivaires, et ainsi l'animal atteint peut à son tour transmettre le virus.

Après inoculation, la rage comporte cinq stades :

- (i) L'incubation qui est la période définie entre l'inoculation et l'apparition des premiers symptômes. Elle peut durer de quelques jours à plusieurs années, en fonction de de la charge virale reçue, de la localisation et de la gravité de la plaie lors de l'infection.
- (ii) Le prodrome survient à la fin de l'incubation et comprend des symptômes semblables à ceux causés par une infection virale (fièvre, malaise, maux de tête)
- (iii) La maladie neurologique aiguë correspond à l'apparition des symptômes neurologiques. On distingue ainsi la maladie neurologique encéphalitique appelée "rage furieuse" (représentant environ 85% des cas) et la maladie neurologique paralytique appelée "rage muette".
La rage furieuse démarre sur une anxiété se traduisant par une hydrophobie qui produit des spasmes musculaires pharyngiens intenses à la vue, au contact ou au son de l'eau. L'état du malade se dégrade avec l'apparition de tachycardie, augmentation du rythme respiratoire, fièvre, hypersalivation, hyperactivité et enfin un délire franc.
Au contraire la rage paralytique engendre une paralysie flasque ascendante et des troubles sensoriels (Warrell, 1976).
Une forme plus rare de la maladie est associée à des convulsions et à des symptômes moteurs et sensoriels plus profonds, pouvant être corrélés au fait que chez certains patients atteints, la consommation d'oxygène cérébral est considérablement réduite, ce qui induit une atteinte cérébrale irréversible.
- (iv) Le coma peut débuter dix jours après l'apparition des symptômes de la maladie neurologique aiguë, développer des apnées prolongées et avoir une paralysie flasque.
- (v) La mort survient rapidement après le coma. Les causes peuvent résulter d'une insuffisance cardiopulmonaire ou être liées à la gravité de l'encéphalite.

1.3.3. Traitement

Lorsque les premiers symptômes de la rage apparaissent, il n'y a pas de traitement efficace et l'issue est forcément fatale. Les travaux de Pasteur ainsi que ceux des prédécesseurs oubliés, Toussaint et Galtier, puis le travail de Roux visant à atténuer le vaccin vivant de Pasteur (Laurioz, 2005), ont permis de développer les premiers vaccins antirabiques afin de prévenir l'apparition de la maladie, cela concerne actuellement les animaux domestiques mais également les personnes exposées (personnel de laboratoire,

pays à risque). Des campagnes de vaccination orale des animaux sauvages ont également été réalisées utilisant des appâts piégés par des virus vivants atténués.

Après la morsure d'un animal enragé, il est possible d'éviter la maladie par l'utilisation d'un vaccin antirabique en prophylaxie ou l'injection d'immunoglobulines antirabiques. Ce traitement est possible avant l'apparition des symptômes. Aucune prophylaxie n'est possible une fois que le virus a atteint le système nerveux central. Dans ce cas, le pronostic est très mauvais. Parfois, les soins intensifs ont produit des résultats prometteurs : il est possible de prévenir les complications potentiellement mortelles (Warrell, 1976) mais la gravité de l'encéphalite constitue le dernier obstacle à la survie.

1.4. Structure de la particule virale des Rhabdovirus

Les Rhabdovirus sont des virus enveloppés qui possèdent un génome non segmenté constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité négative, qui n'est pas traduisible en protéine car est incapable de recruter des ribosomes et est donc non infectieux isolément. De façon très générale, en microscopie électronique, le virion a une forme caractéristique en obus avec une base plate et une extrémité arrondie (Figure 4 A). Les virions du genre Nucleorhabdovirus comme par exemple le virus de la mosaïque du maïs, apparaissent quant-à-eux bacilliformes et ont leurs deux extrémités arrondies (Figure 4 B).

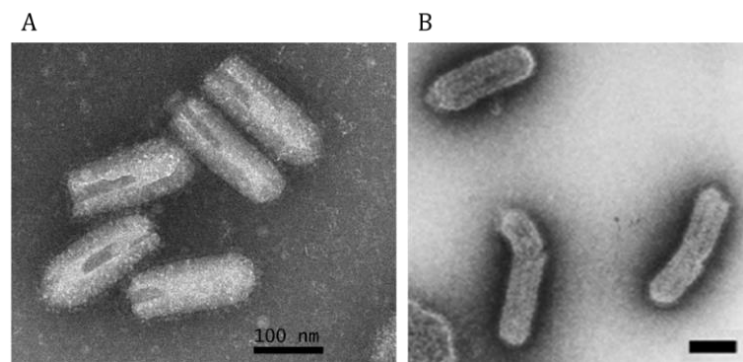


Figure 4. Cliché de Rhabdovirus par EM après coloration négative.

A. VSV. B. Virus de la mosaïque du maïs. Les barres d'échelle représentent 100 nm.

Au sein d'un même genre, les virus ont en général la même organisation génomique, particulièrement en ce qui concerne le nombre et les emplacements des gènes accessoires. Le génome, de taille allant de 10,8 à 16,1 kb (Walker et al., 2015), contient jusqu'à une douzaine de gènes, dont cinq seulement sont communs à tous les membres de la famille. Ces gènes communs codent, par ordre d'apparition dans le génome (Flamand and Delagneau, 1978; Tordo et al., 1986a) pour la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la glycoprotéine (G) et l'ARN-polymérase ARN-dépendante (L) (Figure 5). Le génome est associé à N, L et P pour former la ribonucléoprotéine (RNP), qui est enroulée en une structure hélicoïdale à l'intérieur de la particule virale et qui est séparée de la membrane virale par la protéine M. M tapisse l'intérieur de la membrane virale et établit un lien entre celle-ci et la RNP. A la surface du virion on retrouve une unique protéine transmembranaire : la glycoprotéine virale (G) (Figure 5).

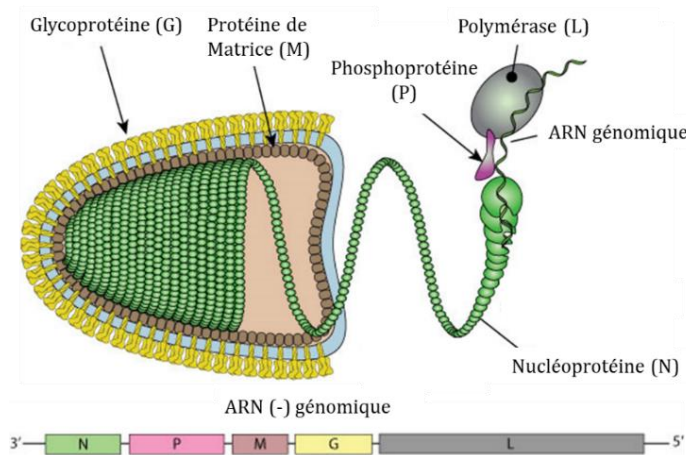


Figure 5. Organisation de la particule virale et génome des Rhabdovirus.

Adapté de ViralZone, 2017, Swiss Institute of Bioinformatics.

1.5. Le cycle viral

1.5.1. Entrée virale

Le cycle viral des Rhabdovirus est initié par la liaison de G aux récepteurs cellulaires. La particule virale pénètre ensuite dans la cellule par voie endocytaire, puis l'acidification de l'endosome dans lequel le virus a été internalisé induit un changement conformationnel de G depuis une conformation pré-fusion (ou native) vers une conformation post-fusion (ou finale). Ce changement conformationnel catalyse la fusion des membranes virale et endosomale. La fusion permet la libération de la RNP virale dans le cytoplasme de la cellule pour les étapes ultérieures du cycle (Figure 6).

Les étapes du cycle viral médiées par G seront abordées en détail dans la partie 2 de l'introduction.

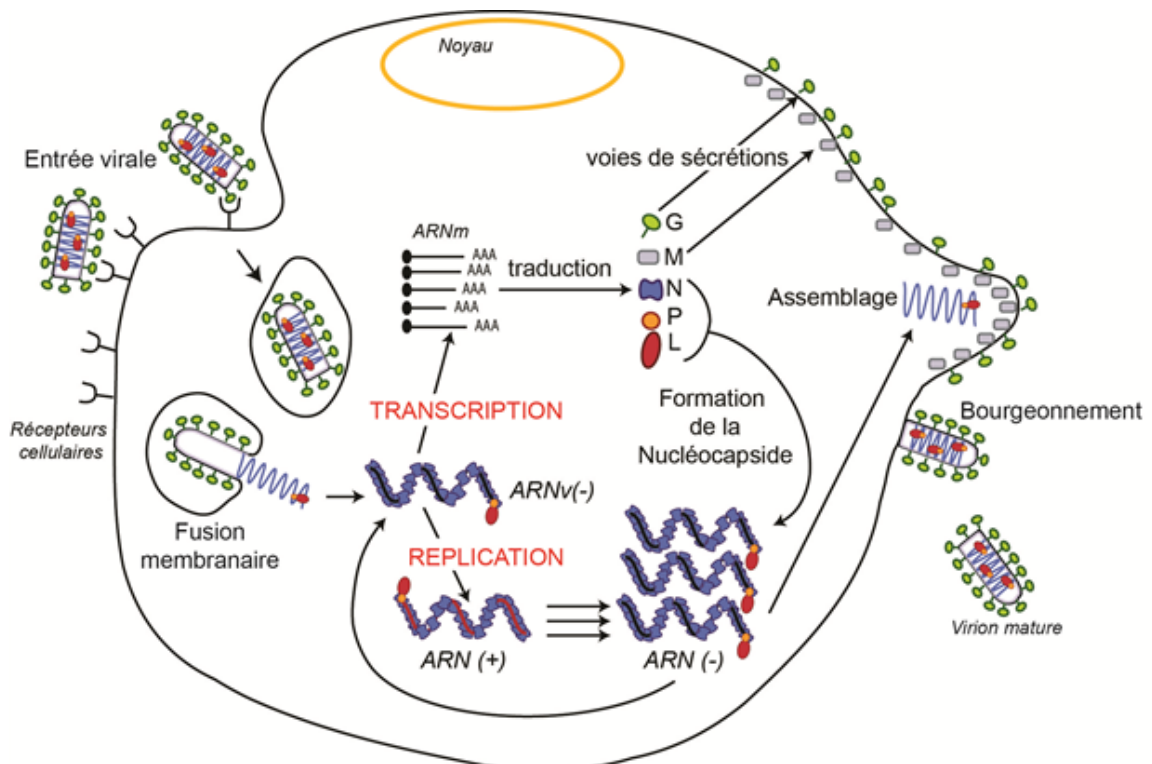


Figure 6. Cycle viral des Rhabdovirus.

Adapté de Albertini et al., 2011.

1.5.2. Synthèse des composants viraux de VSV et de RABV

1.5.2.a. La transcription virale

Le génome viral arrivant dans le cytoplasme est toujours associé à la nucléoprotéine N. A son extrémité 3', il débute par une séquence, codant pour un ARN leader non codant (Conzelmann, 1998; Tordo et al., 1986b), qui régule la transition de la transcription vers la réplication (Figure 7). Le génome code ensuite pour les gènes des cinq protéines virales dans l'ordre N,P,M,G,L (Flamand and Delagneau, 1978). Les gènes viraux sont bordés par des régions intergéniques contenant des séquences conservées représentant les signaux d'initiation et de terminaison/polyadénation de la transcription (Hinzman et al., 2008; Tordo et al., 1986a) (Finke 2000) (Figure 7). A l'extrémité 5' se trouve une autre région régulatrice dite trailer (Figure 7). La région leader en 3' du génome et trailer en 3' de l'antigénome contiennent les promoteurs de réplication pour la synthèse de l'antigénome et du génome respectivement. (Conzelmann and Schnell, 1994; Finke and Conzelmann, 1997; Schnell et al., 1994)

La RNP, appartenant au virus entrant, une fois libérée dans le cytoplasme après la fusion, (Figure 6, étape 3), permet une première étape de transcription qui ne dépend que des constituants viraux : le complexe N-ARN sert de matrice à la polymérase virale L et son cofacteur P. Cette première étape est appelée transcription primaire. Elle se fait selon un modèle « stop-start » (Testa, 1980), la polymérase qui possède un site d'entrée unique à l'extrémité 3' du génome (Emerson, 1982) se fixe sur le promoteur transcriptionnel localisé dans la région leader qu'elle transcrit jusqu'à rencontrer le « gene start » du premier gène et démarrer la transcription de celui-ci ; elle le coiffe et le transcrit jusqu'à rencontrer le site de poly-adénylation sur laquelle elle bégaie pour ajouter la queue polyA. Puis la transcription s'interrompt sur les 3 nucléotides de la région intergénique avant de se réinitier pour transcrire le gène aval (Figure 7) (Barr et al., 1997; Stillman and Whitt, 1999 ; Abraham et al., 1975; Ivanov et al., 2011; Ogino and Banerjee, 2007).

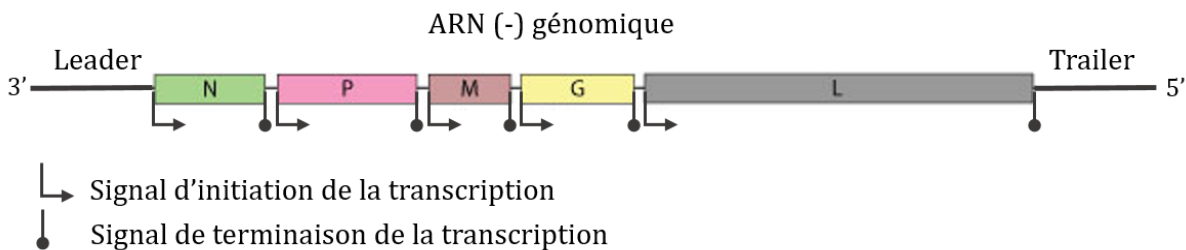


Figure 7. Schéma du génome viral

L'efficacité de la ré-initiation de la transcription au niveau du gène suivant n'est pas de 100% (Finke et al., 2000). Comme la polymérase n'a qu'un site d'entrée sur le génome, cela entraîne une transcription décroissante des gènes viraux en fonction de leur position dans le génome (Iverson and Rose, 1981) et donc un gradient de transcrits en fonction de leur ordre d'apparition des gènes dans le génome. Ainsi la quantité d'ARNm de N est supérieure à celle de P, elle-même supérieure à celle de M et ainsi de suite jusqu'à celle de l'ARNm de L qui sera le moins abondant (Figure 8).

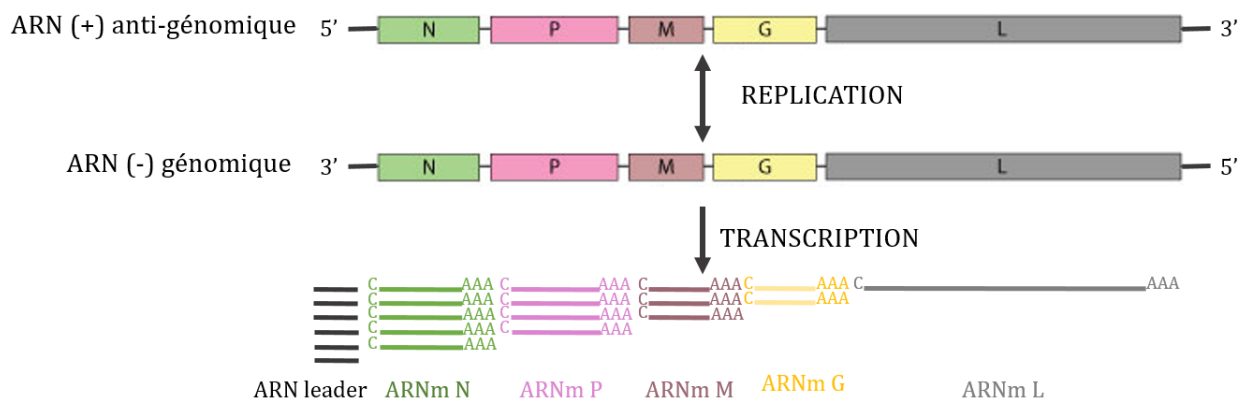


Figure 8. Schéma de la réplication et transcription virale

1.5.2.b. La traduction des messagers viraux

Durant l'infection virale, la machinerie de traduction de l'hôte est détournée, ce qui provoque une baisse de traduction des ARNm de l'hôte au profit des ARNm viraux. Il semble également que la voie d'initiation de la traduction des ARNm de VSV et de RABV soit différente de celle des ARNm cellulaires (Lee et al., 2013). La protéine RPL40, appartenant à la sous-unité 60S du ribosome, semble être spécifique de cette voie de traduction propre. Il a été montré que la traduction des ARNm de VSV est dépendante de RPL40 qui est aussi requise pour la multiplication de RABV.

La présence d'un peptide signal au début du gène de la glycoprotéine permet sa translocation co-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique (Figure 6).

1.5.2.c. La réplication virale

Lorsque la quantité de protéines virales, en particulier de nucléoprotéines, synthétisées est suffisante, L change son activité de transcriptase pour une activité réplicase (Figure 8,9). L associée à P copie alors le génome négatif en un brin antigénomique positif qui à son tour servira de matrice à la synthèse de nouveaux génomes viraux par ce même complexe L-P. Le génome et l'antigénome sont encapsidés, de façon concomitante à leur synthèse, par la nucléoprotéine. L'association de N à l'ARN viral est régulée par P qui joue le rôle de chaperon pour la protéine N (Peluso and Moyer, 1988). La P empêche la N soluble, non associée à l'ARN (N^0) d'interagir avec les ARN cellulaires en formant le complexe N^0 -P. La différence de force des promoteurs génomique et antigénomique se traduit par des proportions différentes de génomes et d'antigénomes dans les cellules infectées. Ainsi, il y a 50 fois plus de génomes qui sont synthétisés que d'antigénomes. Les génomes neo-synthétisés pourront être ensuite incorporés dans de nouveaux virions lors des étapes d'assemblage ou servir de matrice pour la réplication ou la transcription secondaire.

Le mécanisme faisant passer de la transcription à la réplication de la polymérase virale est encore mal compris. Il semble être lié à l'encapsidation des ARN leader par le complexe N^0 -P, (Blumberg and Kolakofsky, 1983; Blumberg et al., 1981). La transition de la transcription vers la réplication implique donc qu'il y a suffisamment de N à avoir été synthétisée. La protéine M de RABV est également proposée comme régulateur de cette transition puisqu'elle inhibe la transcription virale tout en stimulant la réplication (Finke, 2003; Finke and Conzelmann, 2003).

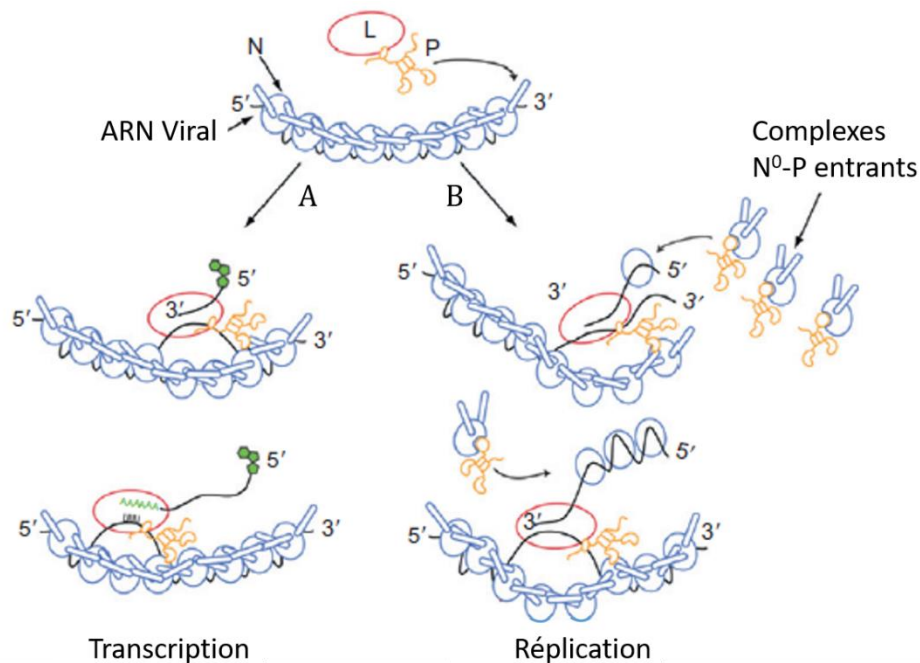


Figure 9. Schéma de la transcription et de la réplication du virus de la rage.

D'après Albertini et al., 2011. Pendant la transcription et la réplication, la sous-unité catalytique de la polymérase L est associée à un dimère de P. La liaison de L-P à une sous-unité de N dans la nucléocapside déclenche probablement une libération locale d'ARN permettant l'accès de la polymérase virale à l'ARN viral. Au cours de la transcription (A), l'ARNm est coiffé et méthylé à son extrémité 5' naissante. Pendant la réplication (B), l'ARN nouvellement synthétisé est instantanément encapsidé par les complexes N⁰-P entrants. L'extension du processus de réplication conduit à la production d'un nouveau complexe N-ARN génomique ou antigénomomique encapsidé.

La transcription et la réplication ainsi que l'assemblage des RNP se font dans des usines virales qui concentrent les protéines et ARN viraux, et des facteurs cellulaires. Dans les cellules infectées par le virus de la rage, les usines virales sont appelées corps de Negri (CN), et ont des propriétés d'organites liquides (Lahaye et al., 2009; Nikolic et al., 2016, 2017). Ces usines sont très dynamiques : des RNPs en sont éjectées et importées via un transport dépendant des microtubules. P effectue la navette entre le cytoplasme et les CN dans lesquels elle est concentrée, permettant le recrutement de protéines cellulaires au sein des CN (Nikolic et al., 2017).

Des corps d'inclusion avec des propriétés d'organites liquides sont aussi formés dans le cytoplasme des cellules infectées par VSV et servent eux aussi de sites de réplication du VSV (Heinrich et al., 2018).

1.5.3. Assemblages et bourgeonnement

La membrane virale est composée à 50% de protéines et 50% de lipides. Sa composition lipidique est très proche de la membrane dont elle provient, cependant elle est enrichie en cholestérol. En effet les virions bourgeonnent à des endroits particuliers de la membrane cellulaire. Il s'agit de zones où se trouvent les radeaux lipidiques enrichis en cholestérol ainsi que les protéines virales qui seront associées à la membrane des virions en devenir (Brown and Lyles, 2003). La protéine de matrice M et la glycoprotéine G y sont présentes et permettent l'assemblage des nouveaux virus au site de bourgeonnement.

Les virions sont directement assemblés au niveau du site de bourgeonnement. Le bourgeonnement pour VSV a lieu très majoritairement à la membrane et implique le détournement de la machinerie cellulaire ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Chen and Lamb, 2008) (Figure 10). La machinerie ESCRT est responsable de la formation des corps multivésiculaires (MVB de l'anglais multivesicular bodies) et le bourgeonnement de vesicule au sein des MVB est topologiquement équivalent au bourgeonnement des virions dans le milieu extracellulaire.

Dans le cas de la rage, le bourgeonnement s'effectue à la fois à la membrane plasmique et au niveau des corps de Negri lorsque ceux-ci s'entourent d'une double membrane aux temps tardifs de l'infection. Il dépend aussi du complexe ESCRT.

L'inhibition de VPS4, une ATPase qui dissocie le complexe ESCRT à la fin de la réaction de bourgeonnement, conduit à l'inhibition de l'étape finale chez VSV, c'est-à-dire la fission membranaire conduisant au relargage du virus dans le milieu (Taylor et al., 2007).

Pour RABV, la glycoprotéine semble faciliter le processus de sortie des virions et lorsqu'elle est absente, l'efficacité de bourgeonnement est réduite (Mebatsion et al., 1996). M est indispensable car en son absence, il n'y a plus de bourgeonnement (Mebatsion et al., 1999). Pour VSV, G s'accumule au niveau de la membrane en recrutant et concentrant la protéine M au site de bourgeonnement (Schnell, 1998). Par ailleurs, lorsque M est exprimée en absence des autres composants viraux, on observe le bourgeonnement de vésicules. (Justice et al., 1995). De plus, il apparaît que les RNP cytoplasmiques doivent subir une étape d'amorçage qui leur permet de pénétrer dans la voie d'assemblage. Un tel événement d'amorçage pourrait être dû à l'association de petites quantités de M dans une conformation distincte (protéine M initiatrice sur Figure 10) aux RNP. Ce complexe RNP-M initiatrice interagirait avec les protéines M associées à la membrane déclenchant la condensation des RNP (Jayakar et al., 2004).

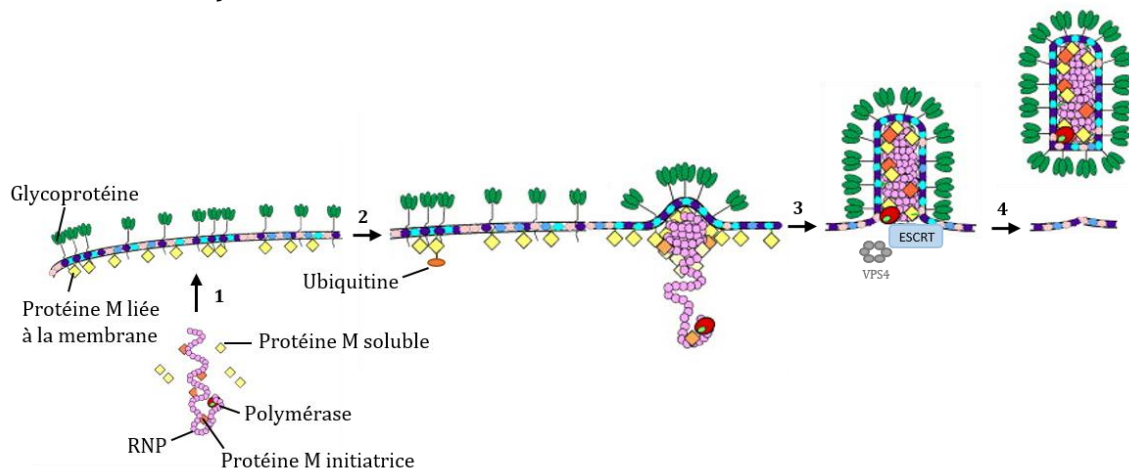


Figure 10. Modèle d'assemblage et de bourgeonnement des Rhabdovirus.

Adapté de Jayakar et al, 2004. **1.** Les RNP qui ont lié une petite quantité de M initiatrice, s'associent au feuillet interne de la membrane plasmique via une interaction avec la M membranaire. **2.** L'interaction des RNPs avec les protéines M liées à la membrane déclenche la condensation de la RNP, ce qui entraîne la formation de sites de bourgeonnement. Ces sites se forment préférentiellement au niveau des régions de la membrane plasmique qui contiennent des concentrations localement élevées de G. Au niveau de ces sites, la protéine recrute la machinerie ESCRT. **3.** La condensation de la RNP au niveau du site de bourgeonnement continue en interagissant avec les protéines M liées à la membrane, ce qui entraîne la protrusion du virion en formation. **4.** La machinerie ESCRT, permet l'étape finale du bourgeonnement des virions, i.e. la fission membranaire.

1.6. Les protéines virales et leur implication dans l'infection

Le génome des Rhabdovirus code le plus souvent pour 5 protéines structurales, c'est le cas de VSV et de RABV. Nous l'avons vu, la quantité de protéines produites dans la cellule infectée dépend directement de la place du gène dans le génome. Cette quantité relative dans la cellule n'est pas retrouvée dans le virion néosynthétisé. Les Rhabdovirus ont donc peu de protéines permettant d'assurer l'ensemble des fonctions nécessaires au bon déroulement du cycle et au détournement des machineries cellulaires. Le virus doit également échapper au système immunitaire et certaines protéines virales ont pour rôle de neutraliser les défenses cellulaires. Ces cinq protéines virales sont par conséquent multifonctionnelles. Ce sont ces différents rôles et les mécanismes employés qui vont être décrits de façon succincte dans la partie suivante.

1.6.3. La ribonucléoprotéine

La RNP regroupe la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P et la polymérase L, en un complexe liant l'ARN viral, et permettant les fonctions de transcription et réplication du génome viral.

1.6.3.a. La nucléoprotéine

Fonction

La protéine N encapside les ARN génomiques et antigénomiques formant ainsi la nucléocapside (NC), ce qui les protège des nucléases cellulaires et empêche également l'activation de la réponse immunitaire innée (en évitant la formation d'ARN double brin). La polymérase sous forme du complexe P-L n'est pas processive sur l'ARN nu au-delà de 18 nucléotides. La processivité nécessite à la fois que la matrice d'ARN soit recouverte d'un homopolymère continu de la protéine N sous forme d'une nucléocapside hélicoïdale et la fixation à la nucléocapside du complexe P-L via la P (Morin et al., 2017).

Structure

La protéine N présente une forte affinité pour l'ARN indépendamment de l'origine, de la longueur ou de la séquence de celui-ci. Elle peut donc s'assembler avec les ARN cellulaires ou génomiques en formant des structures en forme d'anneaux fermés contenant une dizaine de sous-unités, ou en longs filaments hélicoïdaux, en fonction de la taille de l'ARN avec lequel elle interagit (Iseni et al., 1998).

La structure à basse résolution des complexes N-ARN a d'abord montré que l'ARN était localisé à l'intérieur de l'anneau, protégeant ainsi le squelette phosphodiester (Chen et al., 2004; Iseni et al., 2000). Les analyses cristallographiques aux rayons X des complexes N-ARN de RABV et de VSV ont ensuite apporté plus de détails. Les anneaux de N ont révélé que la protéine est composée de deux domaines N-terminal (NTD) et C-terminal (CTD), formant entre eux un sillon contenant des résidus basiques accueillant l'ARN (Figure 11).

La transcription et la réplication d'un mini-réplicon de VSV sont abolies ou diminuées par des mutations de ces résidus basiques (Rainsford et al., 2010). Chaque sous unité de N lie neuf nucléotides. (Albertini et al., 2006; Green, 2006; Iseni et al., 1998; Schoehn et al., 2001).

Dans les complexes N-ARN, chaque N est associée aux N voisines. Le NTD d'un protomère N s'étend sur N+1 et le CTD s'étend sur N-1. Cette disposition conduit à l'interaction du NTD du protomère N-1 avec le CTD du protomère N+1 au contact du protomère N (Figure 11) (Albertini et al., 2006; Green, 2006).

La boucle C-terminale de deux N adjacentes dans le complexe VSV N-ARN fournit un site de liaison pour le domaine C-terminal de la phosphoprotéine P (Green and Luo, 2009). Un mode similaire de liaison du domaine C-terminal de la protéine RABV P à la matrice N-ARN a été proposé à partir d'études de modélisation moléculaire (Ribeiro et al., 2009).

Interactome

N existe sous une forme libre (N^0), non liée à l'ARN, uniquement lorsqu'elle est associée à un dimère de P (Masters and Banerjee, 1988) (Mavrakakis et al., 2003). Ce complexe constitue la réserve de N libres, nécessaire à la synthèse de nouvelles nucléocapsides lors de la réplication. Dans ce complexe, le segment N-terminal de P occupe le sillon de liaison à l'ARN de N, empêchant à la fois l'auto-assemblage de N et l'interaction non spécifique avec l'ARN cellulaire. Ce mécanisme assure un approvisionnement constant de N pour l'encapsidation du génome viral (Leyrat et al., 2011; Ruigrok et al., 2011).

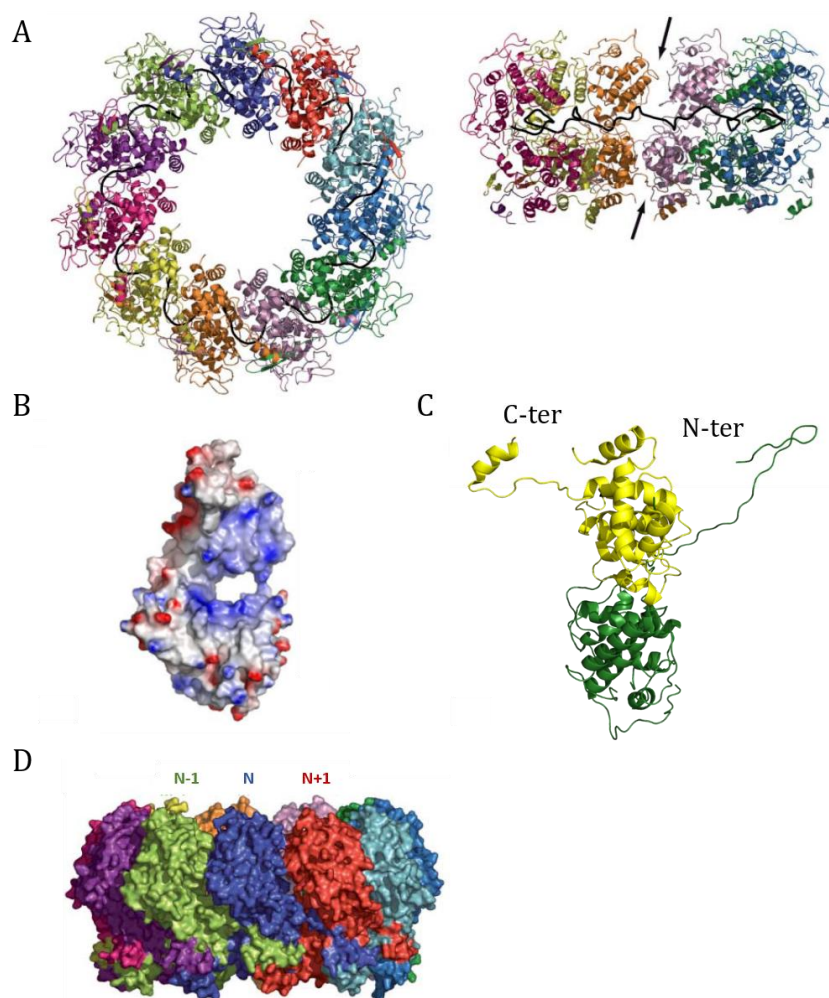


Figure 11. Structure de la N de RABV.

D'après Albertini et al., 2006.

A. Structure cristallographique du complexe N-ARN (PDB : 2GTT). À gauche, le diagramme en ruban de la structure de l'anneau constitué de 11 sous-unités, vu de dessous. Chaque protomère N est coloré différemment. L'ARN est représenté par la ligne noire. À droite, une vue de l'intérieur de l'anneau, le NTD est en haut et le CTD en bas. La flèche du haut indique que les NTDs n'interagissent pas les uns avec les autres; la flèche du bas pointe vers l'interface étendue entre les CTDs.

B. Représentation du potentiel électrostatique de la surface d'un monomère de la N montrant la cavité basique liant l'ARN.

C. Représentation sous forme de ruban du monomère de N. Le NTD de la protéine est en vert et le CTD en jaune.

D. Représentation en surface de

la structure de l'anneau N-ARN, vu de côté montrant que les deux régions charnières stabilisent la polymérisation de N. Le NTD du protomère N s'étend sur le protomère N+1 et le CTD s'étend sur le protomère N-1. Cette disposition conduit à l'interaction du NTD du protomère N-1 avec le CTD du protomère N+1 au contact du protomère N.

1.6.3.b. La phosphoprotéine

Fonction

La phosphoprotéine P est la protéine la moins conservée chez les Rhabdovirus. Elle joue plusieurs rôles au cours du cycle de vie du virus grâce à des interactions directes avec diverses protéines virales. Elle est le co-facteur de la polymérase L et, en se liant à N, elle bloque sa capacité à encapsider l'ARN. P est par ailleurs indispensable à la création des usines virales et pourrait avoir un rôle dans le transport axonal rétrograde.

Enfin, à travers des interactions avec des protéines cellulaires, P est connue pour neutraliser les fonctions de divers facteurs cellulaires impliqués dans les réponses antivirales.

Il existe un mécanisme de « leaky-scanning » lors de la synthèse de la protéine P des Rhabdovirus, qui donne lieu à la synthèse de 4 sous-produits nommés P2 – P5 chez RABV (Chenik et al., 1995), et 2 sous-produits C et C' chez VSV. Lors de la synthèse protéique le premier AUG de l'ARNm de P se trouve dans un environnement peu favorable et donc certains ribosomes vont démarrer aux AUG suivants. Les sous-produits RABV P proviennent d'AUG initiateurs qui sont dans le même cadre de lecture que celui de P et donc correspondent à des P écourtées en N-terminal. Ce n'est pas le cas pour VSV, C et C' sont traduits dans un autre cadre de lecture. Pour RABV ces sous-produits n'ont pas tous la même localisation que P car la partie N-terminale de la P contient un signal d'export nucléaire (NES). Les sous-produits P3, P4 et P5 en sont dépourvus et sont donc localisés dans le noyau. Les sous-produits de P sont connus pour neutraliser les fonctions de divers facteurs cellulaires impliqués dans les réponses antivirales, tels que IRF-3, IRF-7, STAT1 et PML (Rieder and Conzelmann, 2011).

Structure

La P des Rhabdovirus est un dimère en solution (Gerard et al., 2007). Le protomère de P possède une organisation modulaire (Figure 12).

RABV P contient 3 domaines structuraux séparés les uns des autres par deux domaines intrinsèquement désordonnés (Gerard et al., 2009) (Figure 12). Les domaines structuraux comprennent un domaine N-terminal d'interaction avec N⁰, un domaine central de dimérisation, et un domaine C-terminal d'interaction avec la N associée à l'ARN.

Les structures du domaine central et du domaine C-terminal de RABV P sont connues. Le domaine de dimérisation consiste en deux hélices α formant une épingle à cheveux. La cohésion du dimère est assurée principalement par des interactions hydrophobes (Ivanov et al., 2010). La structure cristallographique du domaine C-terminal décrit un domaine en forme de demie poire structuré en hélice α (Mavrakis et al., 2004).

Les domaines de dimérisation, C-terminal et le domaine intrinsèquement désordonné les reliant, sont requis pour la transition de phase liquide-liquide (Nikolic et al., 2017) et donc pour la formation des usines virales.

VSV P suit la même organisation que RABV P. La région N-terminale est très dynamique en solution avec l'apparition transitoire de formes compactes par l'intermédiaire d'hélices α permettant à P d'interagir avec N⁰ (Leyrat et al., 2011).

Le domaine de dimérisation de VSV P est constitué de deux paires de brins β formant chacun un motif en épingle à cheveux. Au centre du domaine se trouve une hélice α . Dans le dimère cette hélice du premier protomère s'associe de façon parallèle par interactions hydrophobes à l'hélice de l'autre protomère, permettant la dimérisation de la protéine. Les interactions entre les brins β fournissent une force supplémetaire pour stabiliser le dimère (Ding et al., 2006). Ce domaine de dimérisation présente donc une organisation différente de celui de la P du RABV.

La région C-terminale forme un domaine compact formant un prisme triangulaire de structure semblable à la région C-terminale de la protéine P rabique (Ribeiro et al., 2008).

Interactome

Les domaines N-terminal (résidus 4 à 40) et C-terminal (résidus 186 à 297) de RABV P interagissent respectivement avec la protéine N⁰ (Mavrakis et al., 2003, 2006) et le complexe N-ARN (Mavrakis et al., 2004; Ribeiro et al., 2009). La structure d'une forme soluble de la N avec un fragment de P de VSV a été résolue (Leyrat et al., 2011). En solution, le complexe N⁰-P est formé d'une molécule de N pour un dimère de P. Le site de liaison N-terminal de P sur N⁰ est localisé au niveau du sillon de liaison à l'ARN de la protéine N⁰ et au niveau du bras de N qui lie la sous-unité voisine dans son processus d'auto-assemblage (Leyrat et al., 2011). Cette liaison empêche donc simultanément l'interaction de N avec l'ARN et l'interaction entre sous-unités conduisant à la formation de la nucléocapside.

Le domaine C-terminal de P lie la N associée à l'ARN et permet donc de faire le pont entre la polymérase L et la matrice N-ARN (Mavrakis et al., 2004). Sur la nucléocapside, le domaine d'interaction est situé au niveau de la zone de contact entre 2 molécules adjacentes de N, ce qui explique pourquoi le domaine C-terminal de P ne peut pas interagir avec une forme libre de N (Mavrakis et al., 2006).

Il a été suggéré que deux régions indépendantes (résidus 1 à 19 et 40 à 100) de RABV P se lient à la partie C-terminale de L (Castel et al., 2009; Chenik et al., 1998), tandis que les résidus 11 à 50 sont responsables de la stimulation de l'activité de L (Morin et al., 2017). Les résidus 65 à 175, qui comprennent le domaine de dimérisation, sont indispensables pour l'activité de transcription (Jacob et al., 2001).

Par ailleurs, P interagit avec de nombreuses protéines cellulaires.

Elle interagit avec la chaîne légère de la dynéine LC8 (Jacob et al., 2001; Poisson et al., 2001; Raux et al., 2000). L'interaction est nécessaire pour une transcription efficace du génome plutôt que pour le transport axonal rétrograde des nucléocapsides dans les cellules neuronales comme cela avait été initialement proposé (Mebatsion, 2001; Tan et al., 2007).

La kinase d'adhésion focale cellulaire (FAK) interagit également avec le domaine de dimérisation central de la protéine RABV P. Elle régule positivement l'activité de synthèse des ARNm et génomiques du RABV est est d'ailleurs associée aux corps de négri (Fouquet et al., 2015).

Pour le RABV, P est la protéine qui va interférer avec la réponse immunitaire innée de l'hôte. Ainsi, la région C-terminale fixe STAT1, un facteur de transcription des gènes induits par l'interféron (Brzozka et al., 2006; Rieder et al., 2011; Vidy et al., 2005) et la protéine PML (Promyelocytic Leukaemia Protein). P est ainsi capable d'interagir avec les corps PML et de les réorganiser, mais le rôle biologique de cette interaction reste encore inconnu. La synthèse de cette protéine est induite par l'interféron. Cette protéine fait partie des corps nucléaires qui portent son nom (corps PML) et aurait un rôle dans la défense cellulaire. Des cellules qui sont dépourvues de PML peuvent produire 20 fois plus de virus que les cellules produisant PML (Blondel et al., 2002).

RABV P est donc un antagoniste multifonctionnel de l'interféron pouvant interférer avec plusieurs processus de signalisation impliquant cette cytokine et ce, dans différents compartiments cellulaires. Pour VSV, le sous-produit C' de P permettrait d'augmenter l'activité transcriptionnelle de la polymérase (Richardson and Peluso, 1996).

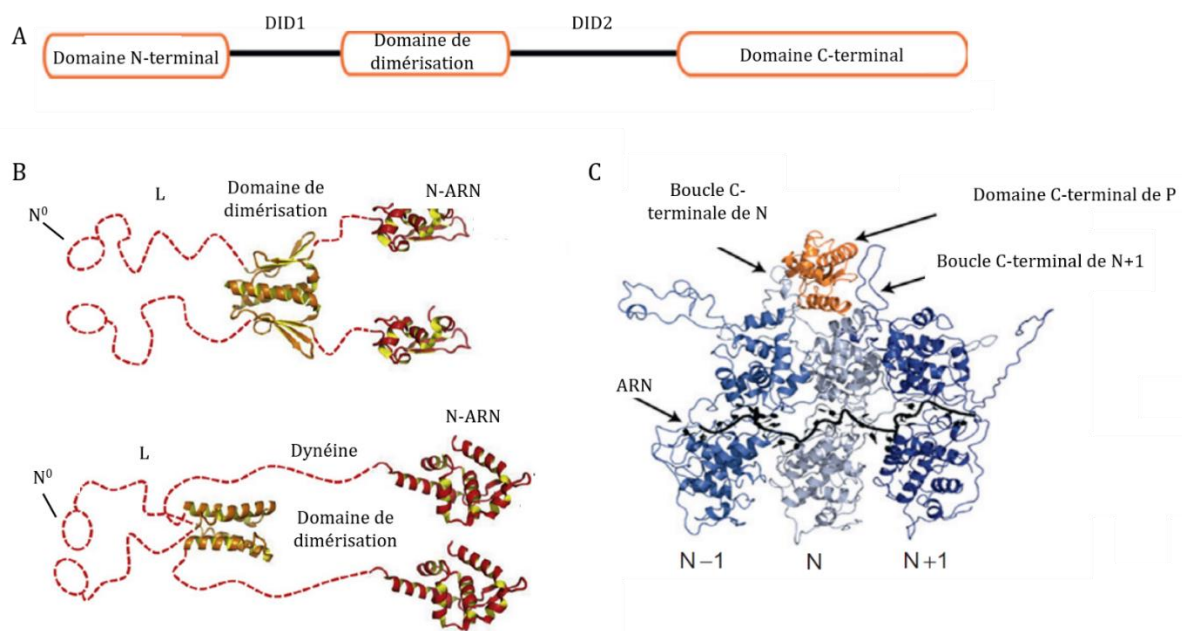


Figure 12. La phosphoprotéine des Rhabdovirus.

D'après Albertini et al, 2011, Ivanov et al, 2011 et Leyrat et al, 2012.

A. Schéma de l'organisation de la phosphoprotéine des Rhabdovirus. Les domaines structurés sont représentés (le domaine N-terminal, le domaine de dimérisation et le domaine C-terminal). DID1 et DID2 représentent les domaines intrinsèquement désordonnés reliant les domaines structurés.

B. Structures des domaines structurés de la P de VSV (en haut) et celle du virus de la Rage (en bas), représentés en ruban, le domaine de dimérisation (PDB: 2FQM pour VSV, 3L32 pour RABV) est en orange et le domaine C-terminal (PDB: 2K47 pour VSV, 1VYI pour RABV) est en rouge, et les régions désordonnées sont représentées par des lignes pointillées. Les partenaires d'interaction de P sont indiqués au niveau duquel ils interagissent.

C. Complexe N-ARN-P. Le diagramme en ruban de RABV P montre le positionnement de la partie C-terminale de P à la surface du complexe N-ARN. Trois protomères de N adjacents sont représentés en bleu et le domaine C-terminal de P en orange.

1.6.3.c. L'ARN polymérase ARN-dépendante

Fonction

L'ARN-polymérase ARN-dépendante doit son acronyme L du fait de sa grande taille, L pour « Large ». En effet elle a un poids moléculaire de près de 240 kDa chez VSV et RABV. C'est une protéine constituée de plusieurs domaines, catalysant la réplication et la transcription ainsi que le coiffage, la méthylation en 5' et la polyadénylation en 3' des ARNm qu'elle synthétise.

Structure

La structure de VSV L a été obtenue par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) (Figure 13) (Liang et al., 2015).

Cette structure contient aussi un peptide de P (résidus 35 à 106) qui a permis de stabiliser L dans une conformation donnée. Les polymérases des Mononegavirales sont globalement conservées. Celles des Rhabdovirus sont plutôt conservées au niveau de la séquence en acides aminés (Bujnicki and Rychlewski; Ogino and Banerjee, 2011; Poch et al., 1990), suggérant des similitudes fonctionnelles et au niveau de l'organisation en domaines (Ogino and Green, 2019). Au niveau N-terminal se trouve le domaine portant l'activité polymérase, suivi du domaine responsable de l'ajout de la coiffe, d'un domaine connecteur le reliant au domaine responsable de la méthylation de la coiffe qui se trouve juste en amont du domaine C-terminal

(Figure 13). Le domaine polymérase possède la structure classique en doigts, paume et pouce de ce type d'enzyme (Figure 13,C). Le sous-domaine de la paume de RABV L possède deux résidus aspartate (D618 et D729) conservés universellement dans d'autres polymérase, qui pourraient servir de résidus catalytiques pour la polymérisation nucléotidique (Genna et al., 2016; Steitz, 1998), et en effet le résidu D729 est nécessaire pour son activité de synthèse d'ARN *in vitro* (Ogino et al., 2018) et *in cellula* (Schnell and Conzelmann, 1995).

L'ajout de la coiffe se fait grâce à une activité polyribonucléotidyltransférase, sa méthylation se fait par une activité méthyltransférase.

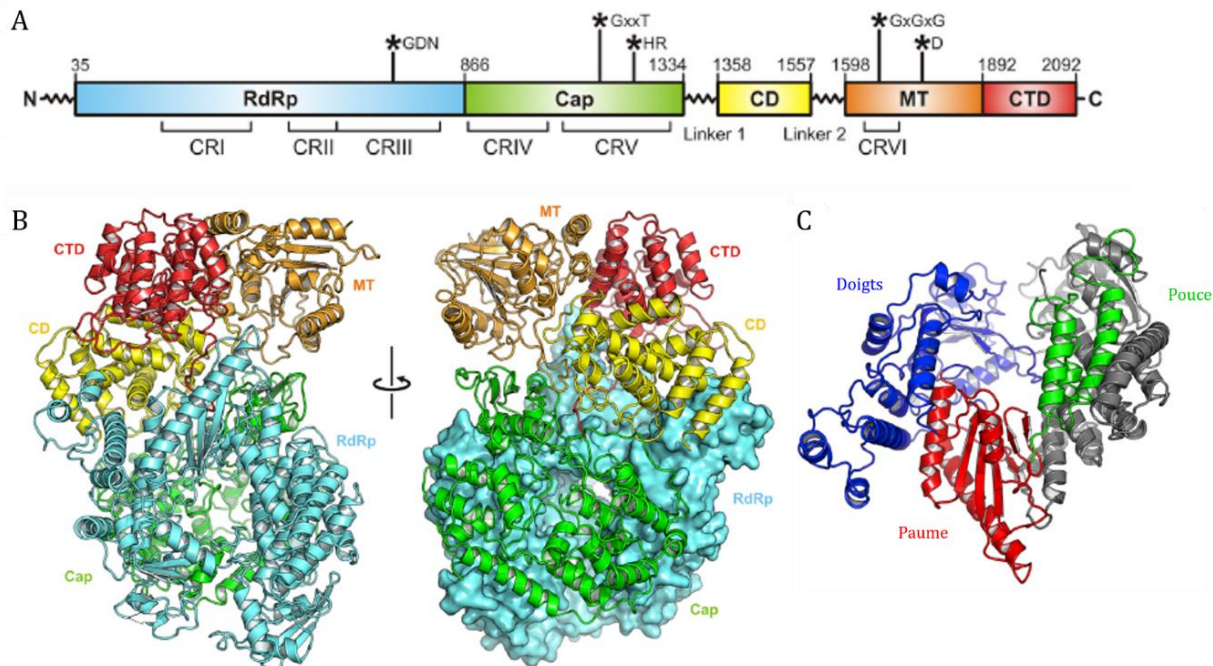


Figure 13. Structure de la polymérase de VSV.

D'après Liang et al, 2015.

A. Organisation en domaines de VSV L. Le domaine de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) est en cyan, le domaine de coiffage (Cap) en vert, le domaine connecteur (CD) en jaune, la méthyltransférase (MT) en orange, le domaine C-terminal (CTD) en rouge. Les régions conservées au sein des polymérase des Rhabdovirus sont étiquetées CR I – VI. Les astérisques indiquent la position des résidus du site actif.

B. Structure de VSV L représentée en diagramme en ruban avec le même code couleur qu'en A (PDB : 5A22).

C. Domaine RdRp. Les résidus 35 à 865 sont représentés sous forme de diagramme en ruban. Le sous-domaine paume est en rouge, les doigts en bleus, le pouce en vert et la région N-terminale en gris.

Interactome

Le peptide N-terminal de P, à travers son interaction avec L a permis de stabiliser une conformation de VSV L (Liang et al., 2015). En effet le repliement fonctionnel de la L nécessite à la fois son association/stabilisation par la P et d'être transitoirement chaperonnée par le complexe HSP90 (Bloyet et al., 2016). VSV L interagit aussi avec le domaine C-terminal de P mais son site de liaison sur la polymérase n'est pas connu (Castel et al., 2009; Chenik et al., 1998; Nakagawa et al., 2017). Cette interaction stimule l'initiation et l'élongation de la transcription médiée par VSV L (Morin et al., 2017; Ogino et al., 2018).

Les résidus 1079 à 1083, appartenant au domaine responsable du coiffage des ARNm, de RABV L interagissent avec la protéine cellulaire LC8 (Light Chain 8). LC8 régule positivement la transcription en se liant à la fois à P et à L (Bauer et al., 2015; Jacob et al., 2000; Raux et al., 2000).

1.6.4. Les protéines associées à l'enveloppe virale

La membrane virale est associée à deux protéines : la protéine de matrice M localisée sur sa face interne qui joue un rôle lors de l'assemblage et du bourgeonnement et la glycoprotéine G qui joue un rôle essentiel lors des étapes précoces du cycle viral. Le glycoprotéine G, faisant l'objet de ma thèse, sera décrite dans la deuxième partie de cette introduction.

1.6.4.a. La protéine de matrice

Fonction

La protéine de matrice M est une protéine membranaire extrinsèque, associée à la face interne de la membrane virale, via une interaction avec les têtes hydrophiles de lipides chargés négativement, tels que la phosphatidylsérine.

Elle est principalement impliquée dans les étapes tardives du cycle viral, en permettant l'assemblage des particules virales et leur bourgeonnement. Elle permet la compaction de la RNP sous sa forme hélicoïdale retrouvée à l'intérieur des particules virales, avant le bourgeonnement (Newcomb et al., 1982). Cette étape de compaction est rendue possible par les capacités d'auto-assemblage de la M (Gaudin et al., 1995a, 1997).

M possède plusieurs motifs L-domain (late budding domain) ou domaine « tardif ». Ils permettent l'interaction avec des partenaires cellulaires, impliqués dans la formation des MVB. Le premier L-domain de M est un motif PPPY dans sa partie N-terminale, il permettrait l'interaction avec le motif WW de l'ubiquitine ligase Nedd4 (Harty et al., 1999, 2001) et le recrutement de la machinerie ESCRT dans des étapes précoces (Figure 10). L'ubiquitinylation qui en résulte entraîne un adressage aux MVB. Chez VSV, des mutations qui altèrent le motif PPPY de M entraînent son incapacité d'induire le bourgeonnement (Jayakar et al., 2000). Un second motif PSAP est présent sur M, il est impliqué dans l'interaction avec TSG101, composant de ESCRT, qui est impliquée dans les événements tardifs de bourgeonnement chez de nombreux virus enveloppés (Bieniasz, 2006) ; en revanche, à lui seul, ce motif ne confère pas une activité de bourgeonnement efficace dans tous les types cellulaires (Irie et al., 2004; Obiang et al., 2012).

M intervient également au niveau de la régulation de la réplication et de la transcription du génome viral (Connor et al., 2006; Finke and Conzelmann, 2003), mais aussi au niveau de la transcription et traduction cellulaire (Whitlow et al., 2006, 2008). Pour VSV, M interfère en effet avec le transport des ARNm cellulaires du noyau vers le cytoplasme (Faria et al., 2005) et module également la redistribution des facteurs d'épissages grâce à des sous-produits de M produits eux-aussi par un mécanisme de leaky-scanning (Jayakar et al., 2000; Redondo et al., 2015).

M participe à l'invasion neuronale de RABV (Faber et al., 2004). Chez VSV, M inhibe l'activation de NF- κ B en ciblant un événement en amont d'IKK ϵ dans la voie canonique d'induction des interférons (Varble et al., 2016). Elle contribue ainsi à limiter les réponses antivirales de l'hôte.

Chez RABV et VSV, M a aussi un rôle dans l'induction de l'apoptose (Gaddy and Lyles, 2005; Larrous et al., 2010). M cible partiellement les mitochondries et induit une apoptose

mitochondriale par des voies dépendantes des caspases puis indépendantes de celles-ci aux derniers stades de l'infection (Zan et al., 2016).

Structure

Au sein de la famille Rhabdoviridae, les protéines de matrice ont une faible identité de séquence (pouvant tomber à 10% entre certains virus). Elles partagent pourtant une structure remarquablement similaire (Gaudier, 2002; Graham et al., 2008).

Chez VSV et RABV, M est organisée en deux domaines : une extrémité N-terminale flexible et un domaine C-terminal globulaire (Figure 14) (Gaudier, 2002; Graham et al., 2008). Le domaine flexible contient une région riche en lysine, impliquée dans l'interaction avec les lipides chargés négativement, et les deux domaines tardifs mentionnés précédemment, et une région désordonnée (DNTS pour Disordered N-Terminal segment). Le domaine globulaire possède un sillon hydrophobe impliqué dans l'auto-association de M, dans lequel va se positionner le DNTS d'une molécule M adjacente (Assenberg et al., 2010; Graham et al., 2008). Le domaine C-terminal possède également une mini-hélice comportant les résidus AVLA à caractère hydrophobe. Cette hélice chez VSV a été montrée comme étant un motif pouvant aussi permettre l'interaction avec les membranes (Gaudier, 2002; Solon, 2005).

La capacité de M de s'auto-associer et de lier les membranes (Figure 14B), pourrait expliquer l'assemblage et le bourgeonnement (Gaudin et al., 1995a; Solon, 2005).

Les protéines de matrice des Rhabdovirus possèdent de fortes divergences structurales avec celles des autres membres de l'ordre des Mononegavirales (Battisti et al.; Dessen, 2000; Money et al., 2009; Neumann et al., 2009; Ruigrok et al., 2000). Malgré ces différences, elles en partagent les mêmes caractéristiques biochimiques en lien avec leur capacité de promouvoir le bourgeonnement (Solon, 2005).

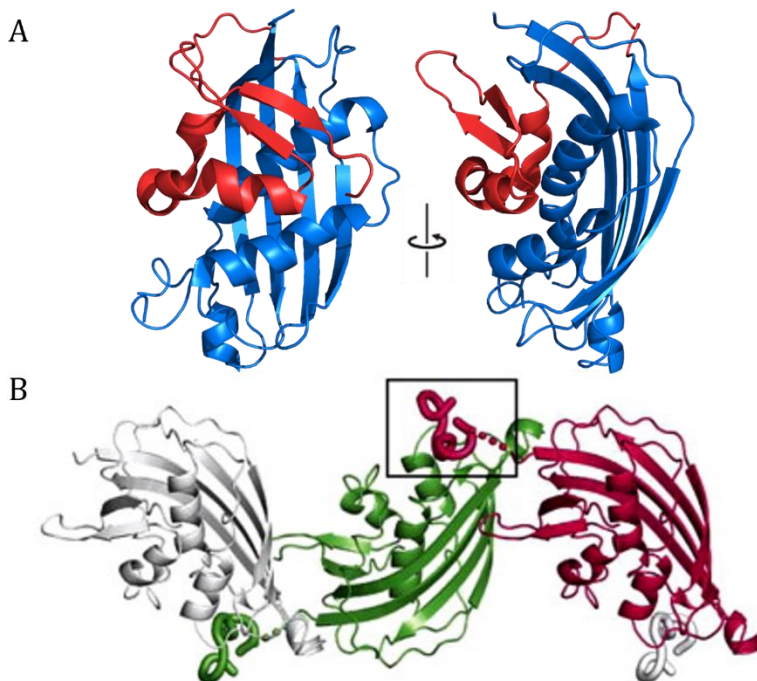


Figure 14. Structure de la protéine de matrice de VSV.

A. La structure (PDB: 2W2R) est représentée en diagramme en ruban. La partie N-terminale est représentée en bleue et la partie C-terminale en rouge.

B. Auto-association des protéines de matrice de VSV. D'après Assenberg et al., 2010. Les résidus du segment N-terminal d'une M, se lient au sillon hydrophobe d'une M adjacente, formant ainsi des polymères linéaires non covalents de M dans les cristaux présentés par Graham et al., 2008.

Interactome

M interagit avec les RNP néosynthétisées au site de bourgeonnement ainsi qu'avec la glycoprotéine. Comme évoqué précédemment, elle est le médiateur principal de l'encapsulation des RNP dans les virions et du recrutement de G au niveau du site de bourgeonnement. Ces interactions avec les protéines virales et son auto-association permettent aux virions d'être assemblés juste avant le bourgeonnement et leur libération dans le milieu extracellulaire. M possède en outre un site de liaison à la dynamine. Cette interaction perturbe l'endocytose médiée par la clathrine, et est importante pour la localisation correcte de G et N durant l'assemblage (Raux et al., 2010).

Par ailleurs, M remplit de multiples fonctions lors de la réplication du génome viral et de la production de virions et participe à la modulation de plusieurs voies de signalisation chez l'hôte favorisant la réplication du virus. Pour remplir ses nombreuses fonctions au sein de la cellule infectée, la protéine M recrute des partenaires cellulaires.

Par exemple, chez VSV, M interagit avec Rae1 et empêche l'export des ARNm cellulaires du noyau vers le cytoplasme (Faria et al., 2005).

VSV M en inhibe de façon générale l'expression des gènes de l'hôte, limitant la réponse immunitaire innée de celui-ci. Chez RABV, l'interaction de M avec RelA43, une protéine régulatrice de la transcription des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée de la famille de NF- κ B, supprime efficacement l'expression des gènes activés par la voie de signalisation NF- κ B (IFN, TNF, IL8 et CXCL2) au cours de l'infection. (Ben Khalifa et al., 2016).

Il a par ailleurs été montré que l'interaction de VSV M avec Nup98 (composant des corps nucléaires) bloque l'export des ARNm et ainsi inhibe l'expression des gènes de la cellule hôte (Her et al., 1997; Von Kobbe et al., 2000). M interagit également avec la sous-unité i du facteur 3 d'initiation de la traduction eucaryote (eIF3i).

Le domaine C-terminal globulaire de VSV M interagit aussi avec LMP2, une sous-unité catalytique de l'immunoprotéasome, et interfère ainsi avec l'assemblage de celui-ci (Beilstein et al., 2015). L'immunoprotéasome favorise la génération de peptides compatibles avec la classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), permettant la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées par les cellules T CD8. L'inhibition de son assemblage permettrait donc aux cellules infectées d'échapper à la détection et à l'élimination par le système immunitaire.

2. La glycoprotéine et l'entrée des Rhabdovirus

Les Rhabdovirus possèdent une unique protéine transmembranaire à leur surface. Il s'agit de la glycoprotéine G. G est impliquée dans les étapes précoces du cycle viral, elle permet dans un premier temps la reconnaissance du récepteur cellulaire à la surface de la cellule hôte. Ensuite, la particule virale pénètre dans la cellule par voie endocytique et catalyse la fusion des membranes virale et endosomale. Cette catalyse est médiée par un important changement de conformation de G depuis son état pré-fusion (conformation observée à pH supérieur à 7 dans laquelle G reconnaît un récepteur à la surface de la cellule) vers son état post-fusion (à bas pH).

2.1. Généralités sur G

La glycoprotéine G est une protéine transmembranaire de type I. La G mature est obtenue après clivage de son peptide signal amino-terminal. Elle est constituée d'environ 500 résidus (495 pour VSV et 505 pour RABV). Néanmoins, les membres du genre Ephemerovirus codent pour des glycoprotéines matures plus longues, ayant jusqu'à 640 acides aminés dans le cas du virus Obhodiang (Blasdell et al., 2012). Il convient de noter que les éphémérovirus codent également une seconde glycoprotéine non structurale (GNS) de fonction inconnue, homologue à la glycoprotéine structurale (Blasdell et al., 2012).

G est ancrée dans la membrane par une seule hélice α transmembranaire (Figure 15 A). La majeure partie de G se situe à l'extérieur de la membrane virale et constitue l'ectodomaine amino-terminal, qui contient les sites de glycosylation, le ou les sites de reconnaissance des récepteurs ainsi que les boucles de fusion, i.e. des motifs hydrophobes permettant l'interaction avec la membrane cible durant la fusion membranaire. Chez RABV et VSV, G possède aussi un site de palmytoylation juste après le domaine transmembranaire (Gaudin et al., 1991a; Rose et al., 1984). Le petit domaine cytosolique (ou intraviral lorsque les virions sont assemblés) est impliqué dans les interactions avec la protéine de matrice M de VSV (Black and Lyles, 1992; Ge et al., 2010), mais peut également se lier à des protéines cellulaires, des kinases et des phosphatases interférant avec les voies de signalisation (Préhaud et al., 2010).

L'ectodomaine des glycoprotéines des Rhabdovirus est N-glycosylé. Le nombre de sites de glycosylation varie d'un virus à l'autre. Néanmoins, le site correspondant à la position 319 chez le virus de la rage est largement conservé au sein de la famille. La glycosylation est nécessaire au bon repliement de G (Gaudin, 1997; Gibson et al., 1981; Hammond and Helenius, 1994; Mathieu et al., 1996). D'une part, les chaînes de sucres augmentent la solubilité des intermédiaires de repliement dans le reticulum endoplasmique (Gaudin, 1997; Mathieu et al., 1996). D'autre part, elles favorisent l'interaction de ces intermédiaires avec la calnexine et la calréticuline (Gaudin, 1997; Hammond and Helenius, 1994), qui sont des lectines chaperons jouant un rôle dans le contrôle de qualité du repliement des glycoprotéines dans le RE. Ce n'est qu'une fois correctement repliées que les glycoprotéines peuvent atteindre l'appareil de Golgi. Les chaînes glycosylées y sont alors maturées, puis G est transportée dans les vésicules d'exocytose jusqu'à la membrane plasmique (Gaudin, 1997; Zagouras et al., 1991).

2.2. Structure de la glycoprotéine des vésiculovirus

La G de VSV (VSV G) est la glycoprotéine la plus caractérisée des Rhabdovirus (Abou-Hamdan et al., 2018; Roche et al., 2008). Il est possible de cliver la majeure partie de l'ectodomaine de VSV G, directement à la surface des particules virales par protéolyse ménagée à la thermolysine. Ce fragment est appelé G_{th} et contient les résidus 1 à 422 de la protéine (l'ectodomaine complet étant constitué de 446 résidus).

Les structures cristallographiques des formes pré- et post-fusion de G_{th} ont été déterminées (Roche, 2006; Roche et al., 2007). Sous ces deux conformations, G est trimérique.

Les structures des conformations pré- et post-fusion permettent de distinguer trois domaines structuraux (Figure 15 B,C) : un domaine de fusion (FD), contenant les boucles de fusion, inséré dans une boucle d'un domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD), lui-même inséré dans une boucle du domaine de trimérisation (TrD) qui est impliqué dans l'oligomérisation de la glycoprotéine sous ses deux conformations.

Ces domaines sont connectés entre eux par des régions charnières (R1 à R4). Les segments R1 et R4 connectent le TrD au PHD, tandis que R2 et R3 connectent le PHD au FD. Le TrD est connecté au segment C-terminal (R5) de l'ectodomaine. Ce segment lui-même est connecté à l'hélice transmembranaire permettant l'ancrage de la glycoprotéine à la membrane (Baquero et al., 2015a).

Le domaine de fusion comprend une structure étendue en feuillets β dont un très allongé constitué de trois brins à l'extrémité desquels sont situés deux boucles comprenant des résidus hydrophobes. Ces boucles sont les boucles de fusion qui interagissent avec la membrane cible au cours du processus de fusion (Figure 15 D)(Baquero et al., 2015a; Roche, 2006; Roche et al., 2007).

Les structures de VSV G sous les conformations pré- et post-fusion ont été observées à la surface virale par tomographie après coloration négative et en cryo-EM (Libersou et al., 2010; Si et al., 2018). Les structures observées sur les particules virales sont en accord avec les structures trimériques de G_{th} obtenues par cristallographie dans les deux conformations.

Durant la transition structurale médiée par le pH permettant de passer de la forme pré-fusion à la forme post-fusion, la protéine subit un très large réarrangement conformationnel. Les domaines structuraux sont relocalisés les uns par rapport aux autres sans changer de structure tertiaire. Cette relocalisation des domaines est due aux changements de la structure des régions charnières (R1-5) (Figure 15 C). Globalement, on peut interpréter le changement de conformation par un retournement du FD et du segment C-terminal autour du TrD (Baquero et al., 2015a; Roche, 2006; Roche et al., 2007).

(Suite légende Figure 15) A. Organisation en domaines de VSV G. La position des sites de glycosylation sont indiqués. Le domaine de fusion (FD) est en jaune, le domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD) en orange, le domaine de trimérisation (TrD) en rouge, les régions charnières R1 et R4 en cyan, R2 et R3 en vert, R5 en violet, le domaine transmembranaire (TM), et Cytosolique (C) dans des nuances de gris.

B. Diagrammes en rubans des trimères pré-fusion et post-fusion de VSV G_{th} et du trimère post-fusion de CHAV G_{th} (PDB: 5I2S, 5I2M et 4D6W). Les lignes en pointillés représentent le segment C-terminal manquant de l'ectodomaine menant au segment transmembranaire (TM). C. Diagrammes en ruban des protomères de VSV G_{th} pré-fusion et post-fusion et du protomère CHAV G_{th} post-fusion. Les différences structurales majeures entre VSV G et CHAV G sont indiquées par des flèches noires. D. Vue rapprochée des boucles de fusion VSV G situées aux extrémités du FD. Les résidus hydrophobes des boucles de fusion de VSV G, impliqués dans l'interaction membranaire sont représentés en rose. Les résidus chargés qui limitent la pénétration du peptide de fusion dans la membrane sont également représentés en jaune.

E. Faisceau d'hélices centrales du trimère VSV G dans sa conformation post-fusion colorés par domaines.

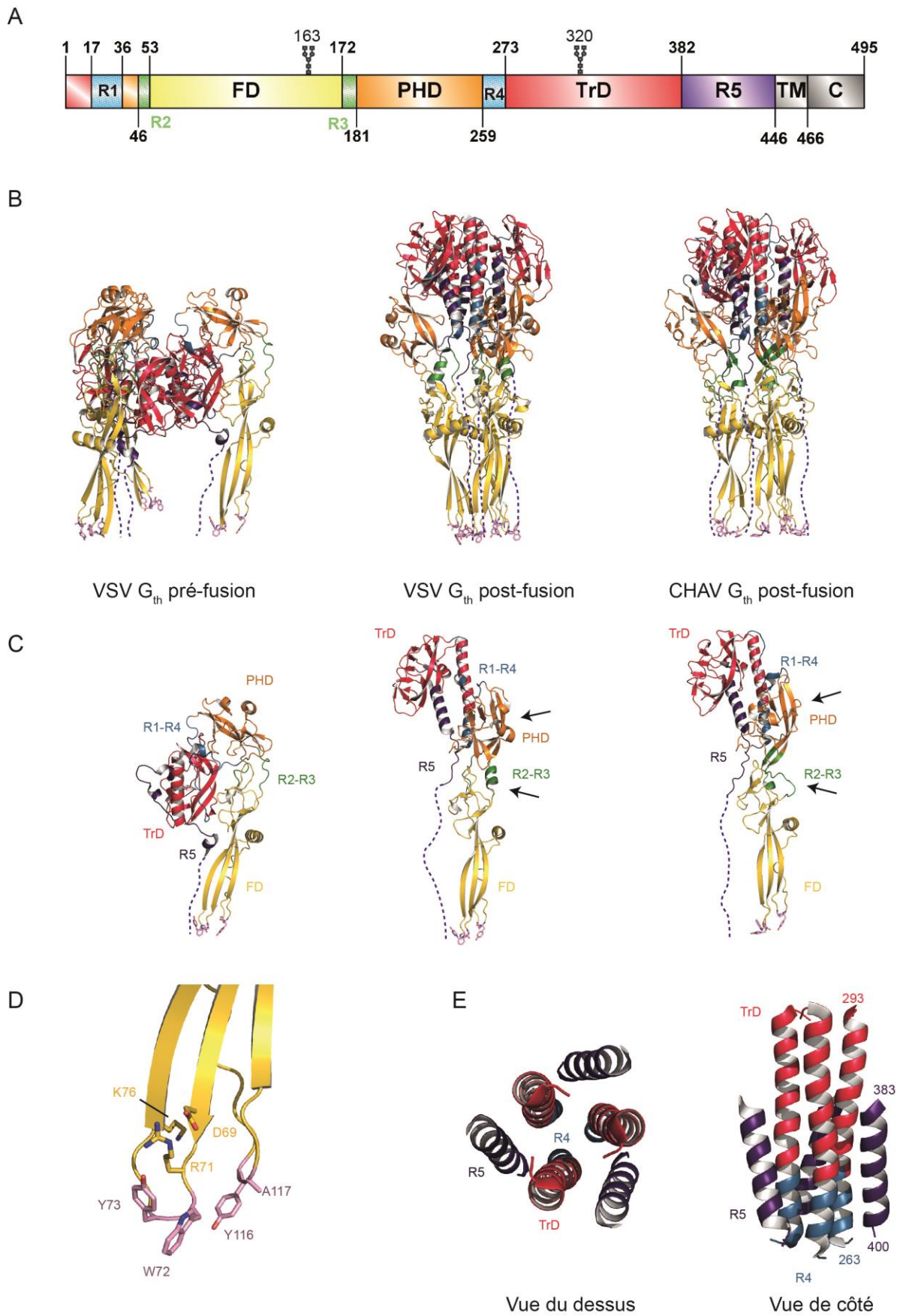


Figure 15. Structures de la glycoprotéine de VSV et de CHAV.
 D'après Belot et al, 2019. (Suite de la légende page ci-contre).

À la fin de la transition structurale, à l'état post-fusion, le cœur de la structure est organisé en un faisceau de six hélices, dont le centre trimérique est composé par les trois hélices centrales du TrD (allongées lors de la transition structurale du segment R4), dont les sillons accueillent trois hélices latérales résultant de la nouvelle structure adoptée par R5 (Figure 15 E) (Baquero et al., 2015a; Roche, 2006; Roche et al., 2007).

Une particularité de la glycoprotéine des Rhabdovirus, est que le changement de conformation induit par l'abaissement du pH est réversible (Gaudin, 2000a; Gaudin et al., 1991b, 1993). C'est une différence majeure avec les protéines fusogènes d'autres familles virales pour qui le changement de conformation est irréversible (la conformation pré-fusion étant alors métastable).

La réversibilité du changement de conformation de la glycoprotéine des Rhabdovirus a été initialement démontré pour VSV G solubilisée avec des détergents (Doms et al., 1987) puis, pour RABV G à la surface de la particule virale, par microscopie électronique (Gaudin et al., 1993).

En fait, il existe un équilibre dépendant du pH entre la conformation pré-fusion et post-fusion ainsi que les conformations monomériques intermédiaires qui permettent de passer de l'une des conformations à l'autre (Albertini et al., 2012; Baquero et al., 2017). Ces intermédiaires conformationnels seront décrits dans la partie 2.5.4.b.

Cet équilibre a été démontré pour les formes solubles (G_{th}) de VSV G (Albertini et al., 2012; Lyles et al., 1990), à la surface du virion pour RABV G et VSV G (Albertini et al., 2012; Libersou et al., 2010; Roche and Gaudin, 2002) et *in vivo* dans le réticulum endoplasmique pour VSV G (Zagouras et al., 1991). Finalement, même l'insertion du domaine de fusion de VSV G et de Chandipura Virus (CHAV) G dans une membrane cible, induite par un faible pH a été démontré comme étant réversible (Albertini et al., 2012; Baquero et al., 2015b; Kim et al., 2017; Pak et al., 1997); cet équilibre thermodynamique est très déplacé vers le trimère post-fusion en dessous de pH 6 (Roche and Gaudin, 2002). Au dessus de pH 7, à la surface du virus, on observe la présence du trimère pré-fusion en équilibre avec des monomères flexibles.

La réversibilité de la transition structurale a un intérêt lors de la biosynthèse de G. En effet, G traverse des compartiments acides lors de sa maturation dans les compartiments acides du Golgi, ce qui la fait transiter vers sa forme post-fusion. La réversibilité lui permet, lorsqu'elle arrive dans le milieu extracellulaire à pH 7,4, de changer de conformation pour acquérir la forme pré-fusion et recouvrir ainsi ses propriétés de fusion nécessaires pour les étapes précoces du cycle infectieux du virion néosynthétisé (Gaudin et al., 1995b).

2.3. Attachement et récepteurs

Comme tous les autres virus, pour infecter la cellule hôte, les Rhabdovirus doivent se lier à des molécules présentes à la surface de la cellule. En fonction des conséquences de l'interaction, ces molécules ont été classées en deux catégories (Marsh et Helenius, 2006). La première catégorie est constituée des facteurs d'attachement. Ce sont des molécules qui interagissent faiblement et de manière non spécifique avec les virions pour les concentrer au niveau de la surface cellulaire. La deuxième catégorie correspond aux récepteurs viraux qui déclenchent activement l'entrée des virus, notamment en favorisant l'internalisation par la voie endocytique.

Plusieurs molécules omniprésentes ont longtemps été considérées comme des récepteurs responsables de l'entrée des Rhabdovirus. Une réévaluation de leur rôle suggère qu'ils sont plutôt des facteurs d'attachement viral.

2.3.1. Les facteurs d'attachement

La phosphatidylsérine (PS) a été proposée comme étant un récepteur du VSV (Schlegel et al., 1983), ce qui était étonnant puisque la PS n'est présente qu'à la surface des cellules apoptotiques. Il a ensuite été démontré qu'en effet la PS n'est pas un récepteur du VSV (Coil and Miller, 2004).

D'autres études ont également proposé que les gangliosides pourraient jouer le rôle de récepteurs dans des cellules apparentées d'embryon de poulet (CER) (Sinibaldi et al., 1985).

L'identification récente de récepteurs réels du VSV et les propriétés biochimiques de la phosphatidylsérine et des gangliosides, suggèrent plutôt que des molécules chargées négativement concentrent probablement les particules de VSV à la surface cellulaire de son hôte où il pourra ensuite se fixer de façon spécifique à un récepteur cellulaire.

Dans le cas de RABV, le traitement des cellules hôtes par différentes phospholipases entraîne une réduction de l'adsorption du virus, suggérant ainsi que certains phospholipides peuvent jouer un rôle dans son attachement (Superti et al., 1984).

De même, un pré-traitement des cellules par la neuraminidase les rend insensibles à l'infection par RABV (Conti et al., 1986). L'incorporation de gangliosides exogènes dans les cellules, les rend à nouveau sensibles à l'infection (Superti et al., 1986). Ici encore ces données semblent suggérer que les molécules chargées négativement concentrent les particules virales de RABV à la surface des cellules.

Cependant tous ces facteurs d'attachement ont été identifiés en utilisant des souches adaptées aux lignées cellulaires de laboratoire. Dans le cas du RABV, les souches non adaptées au laboratoire se multiplient et se propagent exclusivement dans les neurones et, *in vitro*, ils ne peuvent infecter que des lignées cellulaires primaires d'origine neuronale. Il est donc possible que la capacité de lier des molécules chargées négativement à la surface de la cellule hôte soit une conséquence de l'adaptation, et il n'est pas clair que les facteurs d'attachement identifiés soient les facteurs naturels utilisés par les souches sauvages lors d'une infection animale.

2.3.2. Les récepteurs

2.3.2.a. Les récepteurs du VSV

(i) Le récepteur des LDL et les membres de sa famille

Le VSV a un large spectre d'hôtes, il infecte à la fois les cellules des vertébrés et des insectes. Les récepteurs ont été identifiés : ce sont les membres de la famille des récepteurs aux lipoprotéines de basse densité (LDLR) (Finkelshtein et al., 2013). L'expression répandue de cette famille de récepteurs, explique le pantropisme du VSV. Le LDLR est une protéine transmembranaire de type I qui régule l'homéostasie du cholestérol dans les cellules de mammifères (Brown et Goldstein, 1986). Il récupère les lipoprotéines de basse densité (LDL) liées au cholestérol dans la circulation plasmatique. Lorsque ces ligands sont liés extracellulairement par le LDLR (à pH neutre), récepteur et ligand sont internalisés par endocytose dépendante de la clathrine. Dans l'endosome, l'environnement acide et l'appauvrissement en ion Ca^{2+} entraînent un changement de conformation du récepteur qui passe d'une forme extracellulaire ouverte à sa forme fermée endosomale, entraînant le relargage de son ligand dans l'endosome. Le ligand est dégradé ultérieurement par les voies lysosomales (Beglova et Blacklow, 2005; Rudenko, 2002). Le récepteur est ensuite recyclé à la surface de la cellule, sous sa forme ouverte pour lier de nouveaux ligands (Figure 16).

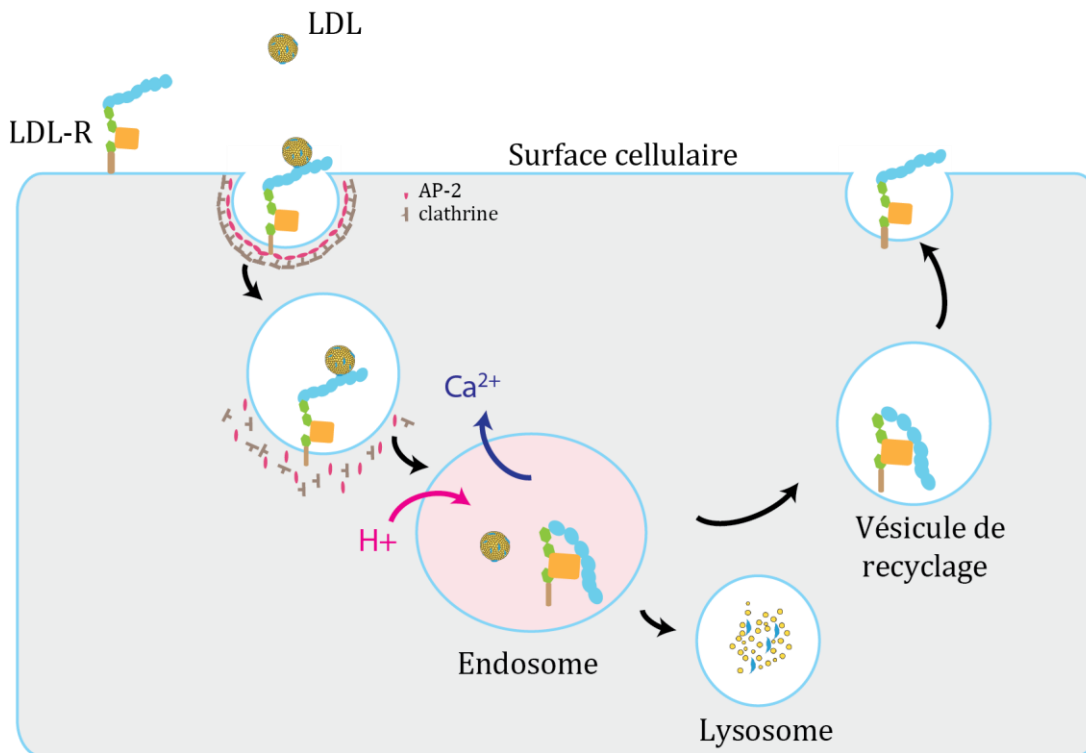


Figure 16. Cycle du LDL Récepteur dans l'homéostasie du cholestérol

L'ectodomaine du LDLR est composé d'un domaine de liaison au ligand, d'une succession de domaines d'homologie du précurseur de facteur de croissance (EGF) et d'un domaine C-terminal O-glycosylé. Le domaine de liaison au ligand est constitué d'un chapelet de 7 domaines riches en cystéine (CR1-CR7). Tous ces domaines sont composés de 40 acides aminés dont 6 cystéines engagées dans 3 ponts disulfures et plusieurs résidus acides formant une cage octaédrale qui fixe un ion Ca^{2+} (Rudenko, 2002) (Figure 17).

Le LDLR a été identifié comme étant le récepteur majeur du VSV dans les cellules humaines et murines (Finkelshtein et al., 2013). Des cellules préalablement incubées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine CR3 du LDLR ont indiqué que le domaine CR3 est indispensable, pour que VSV puisse infecter les cellules. La présence de calcium est elle aussi essentielle à l'infection efficace par le VSV (Finkelshtein et al., 2013). En effet les domaines CR sont bien repliés uniquement en présence de calcium.

En absence du LDLR, VSV peut toujours infecter les cellules grâce à la présence d'autres membres de la même famille du LDLR. Ainsi les membres de la famille du LDLR et le LDLR seraient les principaux récepteurs permettant l'entrée du VSV dans ses cellules-hôtes.

(ii) D'autres récepteurs pour VSV ?

Récemment, il a été suggéré qu'une autre protéine cellulaire : le récepteur couplé à la protéine G, contenant des domaines répétés riches en leucine Lgr4 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4), est essentielle pour l'infection par le VSV (Zhang et al., 2017). Cependant, l'effet de la suppression du gène Lgr4 est particulièrement prononcé lors de l'infection de macrophages péritonéaux qui ne sont pas les cellules hôtes naturelles du VSV. De plus, l'interprétation de plusieurs expériences a été discutée dans un commentaire de l'article original (Rubinstein, 2018). En particulier, pour démontrer l'interaction entre VSV G et Lgr4, les ectodomaines des deux protéines ont été co-exprimés sans leur peptide signal (Zhang et al., 2017). Par conséquent, les protéines n'ont pas été transférées dans le réticulum

endoplasmique et il est donc probable qu'elles aient été mal repliées et agrégées. De même, l'expérience de résonance plasmonique de surface est difficilement interprétable car la plupart des interactions testées sont irréversibles. Enfin, l'ectodomaine Lgr4 apparaît beaucoup moins affiné que l'ectodomaine du LDLR en expérience de neutralisation (Rubinstein, 2018; Zhang et al., 2017). Il apparaît donc que si le rôle de Lgr4 au cours de l'infection par VSV ne peut être exclu, cette molécule n'est probablement pas un autre récepteur viral.

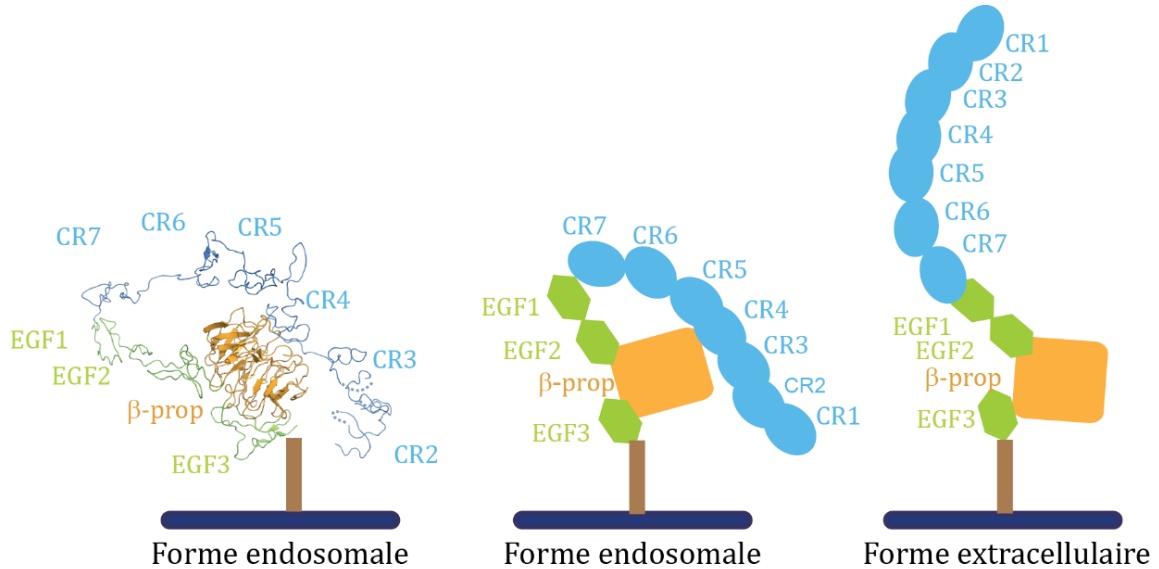


Figure 17. Structure cristallographique de la forme endosomale du LDLR et schéma du LDLR sous sa forme endosomale à pH acide et extracellulaire à pH neutre.

D'après Belot et al, 2019. PDB : 1N7D, Rudenko et al, 2002

2.3.2.b. Les récepteurs de RABV

Quatre protéines ont été proposées pour jouer le rôle de récepteurs de RABV (Figure 18) (Guo et al., 2019).

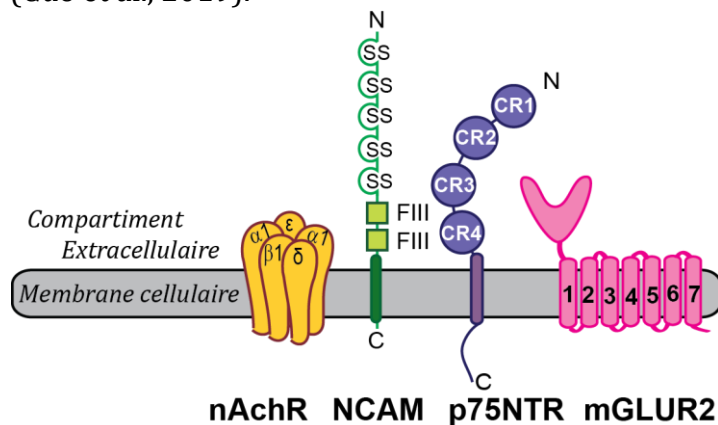


Figure 18. Les récepteurs proposés pour RABV.

Adapté de Belot et al, 2019.

(i) Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine

Un segment de RABV G présente une similarité de séquence avec les neurotoxines curaremimétiques de venin de serpent, qui sont des ligands du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR). Il a donc été proposé que le nAChR puisse agir comme un récepteur du RABV (Lentz et al., 1982, 1984). Cette hypothèse a été renforcée par la démonstration que RABV interagit avec le nAChR purifié (Lentz et al., 1986), plus précisément avec sa sous-unité

α (Gastka et al., 1996). Enfin, une étude dans laquelle des cellules ganglionnaires de la racine dorsale (DRG) de souris (qui sont des structures contenant les neurones sensoriels du système nerveux périphérique) ont été traitées avec plusieurs antagonistes nicotiques, a montré que la mécamylamine et la d-tubocurarine réduisent le pourcentage de neurones infectés (Castellanos et al., 1997). Cependant, il n'existe aucune preuve directe chez les modèles animaux que nAChR soit un récepteur de RABV. En outre, RABV peut infecter des neurones n'exprimant pas nAChR, et nAChR est situé principalement sur la partie musculaire des jonctions neuromusculaires (McGehee and Role, 1995).

Ainsi, bien que le NACHR puisse expliquer la capacité des souches de RABV à se multiplier localement dans des myotubes au niveau du site d'inoculation (Burrage et al., 1985), la propagation du virus dans le système nerveux central nécessite d'autres récepteurs dans les neurones.

(ii) La molécule d'adhésion des cellules neuronales

La deuxième protéine suggérée comme étant un récepteur de RABV est la molécule d'adhésion des cellules neuronales (NCAM) (Thoulouze et al., 1998). En effet, l'incubation de plusieurs lignées cellulaires avec RABV diminue l'expression de surface de NCAM, suggérant que NCAM est internalisé en présence du virus. De plus, le traitement de cellules sensibles au sulfate d'héparane, un ligand de NCAM, ou avec des anticorps anti-NCAM réduisent l'infection par RABV. De même, lorsque le virus est pré-incubé avec une forme soluble de NCAM, il n'est plus capable d'infecter les cellules. Par ailleurs, lorsque des cellules fibroblastiques L résistantes à l'infection sont transfectées avec un gène qui code pour NCAM, elles deviennent sensibles à l'infection. Enfin, l'infection des souris déficientes en NCAM par RABV a entraîné une mortalité légèrement retardée et une invasion cérébrale restreinte (Thoulouze et al., 1998). Ce dernier résultat amène à penser que même si NCAM semble jouer un rôle dans l'entrée du virus, *in vivo* il n'est pas le seul récepteur que RABV puisse emprunter.

(iii) Le récepteur murin du facteur de croissance nerveux de faible affinité

Le récepteur murin du facteur de croissance nerveuse de faible affinité (p75NTR) a été identifié comme ligand d'une forme soluble de RABV G (Tuffereau, 1998). La capacité de RABV G à lier p75NTR est dépendante d'une lysine et d'une arginine aux positions 330 et 333 respectivement, sur la G, qui sont connues pour contrôler la pénétration du virus dans les neurones moteurs et sensoriels de souris adultes (Coulon et al., 1998; Seif et al., 1985; Tuffereau et al., 1989). En outre, l'expression de p75NTR dans des cellules BSR, un clone de cellules de reins de bébé hamster (BHK21) rend la lignée cellulaire permissive pour une souche de RABV de renard non-adaptée aux cellules de laboratoire. Enfin, la G du génotype du lyssavirus de chauve-souris européenne de type 2 (mais pas celle du type 1 ni des virus de Mokola et de Duvenhage) lie également p75NTR (Tuffereau et al., 2001).

Néanmoins, les souris dépourvues de p75NTR sont toujours susceptibles à l'infection, indiquant que l'interaction entre RABV G et p75NTR n'est pas nécessaire pour l'infection de neurones primaires par RABV (Tuffereau et al., 2007). Cependant, des données suggèrent que RABV peut utiliser un transport dépendant de p75NTR pour faciliter son trajet vers le système nerveux central (Gluska et al., 2014).

(iv) Le récepteur métabotropique du glutamate 2

Plus récemment, une stratégie globale, exploitant l'ARN interférent (ARNi) a été utilisée pour cribler les potentiels facteurs de l'hôte utiles à l'infection par RABV dans des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293). Ainsi, le récepteur métabotropique du glutamate 2 (mGluR2) a été identifié comme étant essentiel à l'infection par RABV (Wang et al., 2018). mGluR2 est un récepteur à sept passages transmembranaires et est conservé chez les mammifères. Il est abondant dans le système nerveux central et très rarement exprimé dans d'autres tissus (Ohishi et al., 1993). Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que RABV G interagit avec mGluR2. De plus, des anticorps dirigés contre mGluR2 bloquent l'infection des cellules par RABV et une version soluble du récepteur neutralise également l'infection par RABV. Une diminution de l'expression de mGluR2 à la surface des cellules infectées a été observée et l'internalisation conjointe de mGluR2 et du virus dans les cellules ainsi que leur transport aux endosomes précoces et tardifs montrent également que mGluR2 a les caractéristiques pour être un récepteur de RABV. Cependant, chez les souris, certaines cellules neuronales infectées par RABV semblent en être dépourvues (Wang et al., 2018).

Si on considère l'ensemble des études qui ont été menées pour identifier les récepteurs de RABV, aucun des candidats proposés n'est strictement indispensable pour l'infection, suggérant que le virus peut probablement utiliser plusieurs récepteurs. Ceci est en accord avec des expériences effectuées sur un mutant avirulent, incapable de tuer l'animal adulte, qui ont montré que certaines cellules neuronales permissibles à l'infection d'une souche virulente, ne sont pas infectées par le mutant. Cela suggère que la souche virulente est capable de lier plusieurs récepteurs distincts pour pénétrer dans différents neurones, tandis que le mutant avirulent n'en reconnaît que quelques-uns (Lafay et al., 1991). Enfin, les cellules rénales de singe vert d'Afrique (BS-C-1) qui n'expriment ni p75NTR, ni NCAM, ni nAChR, ni probablement mGluR2 (puisque la lignée BS-C-1 a des caractéristiques de cellules épithéliales) sont sensibles à l'infection par RABV (Piccinotti et al., 2013). Par conséquent, d'autres facteurs d'entrée non identifiés restent à déterminer. Il n'est pas exclu que ces facteurs soient spécifiquement présents dans les cellules épithéliales, et soient nécessaires pour les derniers stades de la maladie, lorsque le virus se propage du système nerveux central aux tissus périphériques.

2.3.2.c. Les récepteurs d'autres Rhabdovirus

On en sait beaucoup moins sur les récepteurs des autres Rhabdovirus. Les récepteurs potentiels identifiés pour VSV et RABV ne sont pas utilisés par les autres virus de cette famille, même appartenant au même genre. Comme mentionné précédemment, les Lyssavirus tels que les virus Mokola, Duvenhage ou celui de chauve-souris européenne de type 1 ne lient pas p75NTR (Tuffereau et al., 2001). De même, nous le verrons dans mon travail de thèse le virus de Chandipura ne lie pas les domaines CR du LDLR (Nikolic et al., 2018). Jusqu'à présent, un seul autre récepteur putatif des Rhabdovirus a été proposé pour le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV), un Novirhabdovirus infectant les salmonidés pour lequel il a été démontré que des anticorps monoclonaux dirigés contre un complexe contenant de la fibronectine, protègent les cellules de l'infection. De plus, la fibronectine purifiée à partir de truites lie spécifiquement VHSV, la fibronectine a donc été proposée comme étant un récepteur pour le VHSV et certains autres Rhabdovirus de poisson (Bearzotti et al., 1999).

2.4. Voie d'entrée des Rhabdovirus dans la cellule-hôte

Après la fixation de leur récepteur, les Rhabdovirus sont internalisés par la cellule par voie endocytaire médiée par la clathrine.

2.4.1. Entrée par endocytose médiée par la clathrine

La liaison des Rhabdovirus à leur récepteur déclenche l'endocytose du virion. Tous les Rhabdovirus étudiés jusqu'à présent, y compris RABV (Lewis and Lentz, 1998; Lewis et al., 1998; Piccinotti et al., 2013; Superti et al., 1984), VSV (Cureton et al., 2009, 2010; Johannsdottir et al., 2009; Sun et al., 2005; Superti et al., 1987), le virus de la fièvre éphémère bovine (BEFV) (Cheng et al., 2012), le virus de la virémie printanière de carpe (SVCV) (Shao et al., 2016) et le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (VNHI) (Liu et al., 2011) utilisent l'endocytose médiée par la clathrine (CME) pour entrer dans la cellule hôte. L'endocytose de RABV, VSV, BEFV et SVCV s'est révélée être dépendante de la dynamine (Cheng et al., 2012; Johannsdottir et al., 2009; Piccinotti et al., 2013; Shao et al., 2016). Cependant, pour RABV et VSV, la présence de la protéine adaptatrice AP-2 (Johannsdottir et al., 2009; Piccinotti et al., 2013) n'est pas nécessaire. Dans le cas de VSV, cela est compatible à l'internalisation du LDLR, qui elle-même n'est pas strictement dépendante de l'AP-2 (Motley et al., 2003).

L'endocytose de VSV est un processus rapide avec un $t_{1/2}$ de 2,5 à 3 minutes (Johannsdottir et al., 2009). Après liaison au récepteur, les virions ne diffusent pas latéralement pour rejoindre des puits préformés mais sont internalisés par des puits qui se forment au niveau ou près des particules virales (Cureton et al., 2009). Des observations similaires ont été faites avec un VSV recombinant, dans lequel VSV G a été substituée par RABV G (Piccinotti et al., 2013).

2.4.2. Entrée dépendante de l'actine

Les Rhabdovirus ont une taille supérieure aux dimensions des vésicules recouvertes de clathrine qui sont classiquement de l'ordre de 60 nm. Les vésicules contenant des particules virales sont plus allongées que les vésicules vides en provenance de la CME. Elles contiennent aussi plus de clathrine et de molécules adaptatrices, mais pas suffisamment pour recouvrir complètement la vésicule contenant la particule virale (Cureton et al., 2009), ainsi la vésicule qui internalise le virus n'est que partiellement recouverte de clathrine (Figure 19).

L'internalisation complète du virus dans la vésicule d'endocytose est dépendante de l'actine (Figure 19), en effet un traitement des cellules avec de la cytochalasine D ou de la latrunculine B, qui détruisent les filaments d'actine, inhibe l'entrée en bloquant la transition des puits contenant le virus en vésicules cytosoliques (Cureton et al., 2009). L'assemblage de l'actine est nécessaire pour que l'entrée de VSV soit efficace en raison de la taille de la particule virale. Au contraire, des particules défectueuses interférentes qui sont plus courtes (de l'ordre de 75 nm de long par rapport aux 100-200nm pour VSV) ne dépendent pas de la polymérisation de l'actine pour leur endocytose (Cureton et al., 2010).

2.4.3. Le transport des Rhabdovirus après internalisation

2.4.3.a. Le transport du VSV dans la voie endosomale

La fusion des membranes virale et endosomale médiée par G survient rapidement après endocytose, 1 à 2 minutes après l'internalisation (Johannsdottir et al., 2009). Compte tenu de la rapidité du processus, il est probable que la transition structurale de G catalysant la fusion membranaire, ait lieu dans les endosomes précoces (Figure 19, voie (i)). Ceci est en accord avec des expériences montrant que RAB5, qui permet la maturation des vésicules endocytiques en endosomes précoces, est nécessaire à l'infection par VSV alors que RAB7, qui permet le passage de l'endosome précoce à l'endosome tardif, ou encore RAB11, qui permet le recyclage des endosomes, n'ont apparemment pas de rôle dans l'infection par VSV (Mire et al., 2010; Sieczkarski and Whittaker, 2003).

Cependant, cette vision classique est contestée par des données expérimentales qui suggèrent que l'activation à bas pH de la fusion de VSV et la libération de la RNP dans le cytosol se déroulent en deux étapes distinctes (Le Blanc et al., 2005; Luyet et al., 2008) (Figure 19, voie (ii)). L'enveloppe virale fusionnerait d'abord avec une vésicule intraluminaire (ILV) dans les MVB. Une seconde étape de fusion (appelée back-fusion, et impliquant l'action d'une machinerie cellulaire) entre l'ILV et la membrane externe du MVB serait alors nécessaire afin de libérer la RNP dans le cytosol.

Les arguments en faveur de cette hypothèse sont les suivants : tout d'abord, la fusion et la libération d'ARN dans le cytosol peuvent être découplées en présence de nocodazole qui dépolymérise les microtubules mais n'a pas d'effet sur la fusion de VSV tout en réduisant considérablement la libération d'ARN (Le Blanc et al., 2005). Deuxièmement, la déplétion par siRNA de plusieurs sous-unités de la machinerie ESCRT (notamment ALIX, HRS, VPS22 et VPS24), qui sont impliquées dans la formation des ILV, réduit l'infection de VSV de 30% à 50% (Le Blanc et al., 2005; Pasqual et al., 2011). Troisièmement, un anticorps monoclonal dirigé contre l'acide lysobisphosphatidique (LBPA) ou bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP), qui sont tous deux des phospholipides spécifiques des endosomes tardifs, inhibe l'infection par VSV de manière dose-dépendante (Le Blanc et al., 2005). Enfin, *in vitro*, il a été démontré que quand le BMP est présent dans des liposomes cibles, il favorise la fusion de ceux-ci avec VSV (Roth and Whittaker, 2011). Par conséquent, les mécanismes précis impliqués dans l'entrée du VSV restent à déterminer. On ne peut exclure que VSV utilise les différentes voies d'entrée en fonction des cellules et de leur état physiologique.

Enfin, plusieurs facteurs chez l'hôte semblent nécessaires à l'infection par VSV. Le récepteur 149 couplé à la protéine G (GPR149), un antigène de cellules souches de la prostate (PSCA) et une protéine Sm-like associée au snRNA U6(LSM5) sont impliqués dans l'entrée virale (Lee et al., 2014). GPR149 est une protéine transmembranaire conservée chez les vertébrés (Edson et al., 2010), tandis que PSCA est une glycoprotéine membranaire surexprimée dans les cancers de la prostate (Reiter et al., 1998). Leur localisation à la membrane cellulaire est compatible avec leur rôle en tant que facteurs d'entrée potentiels (Figure 19). En revanche, LSM5 est principalement située dans le noyau et son rôle dans l'entrée de VSV est probablement indirect.

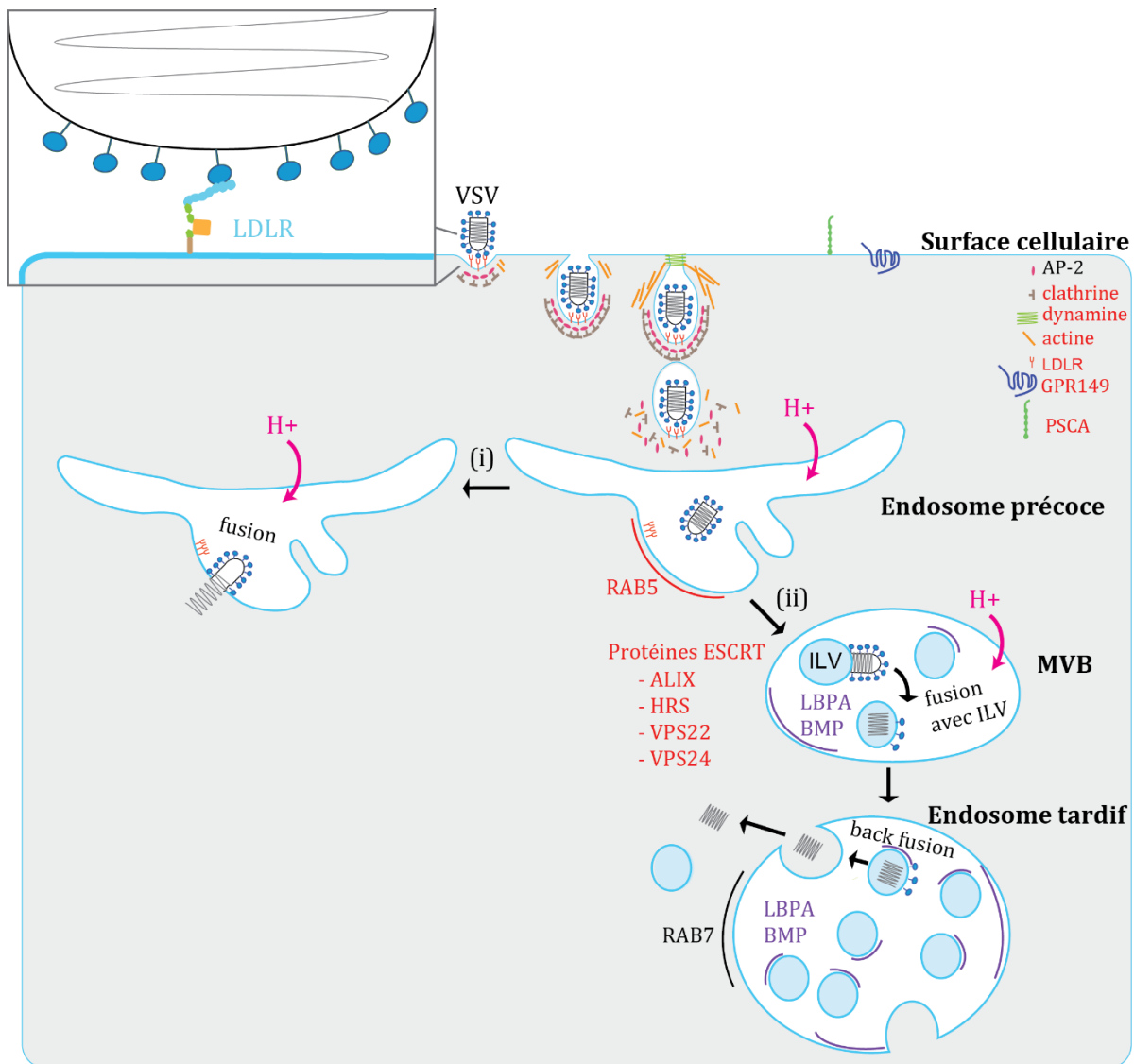


Figure 19. Voies proposées pour l'entrée du VSV dans la cellule hôte.

La liaison de la G de VSV au LDLR déclenche une endocytose des particules de VSV. La vésicule d'endocytose n'est que partiellement couverte par la clathrine. Une entrée virale efficace nécessite une polymérisation de l'actine. Deux voies ont été proposées. Voie (i): la fusion se produit rapidement dans l'endosome précoce et conduit à la libération de la RNP dans le cytoplasme. Voie (ii): à l'intérieur des MVB, le VSV fusionne d'abord avec une ILV dans laquelle la RNP est libérée. Dans l'endosome tardif, ces vésicules livrent la RNP au cytoplasme par un mécanisme de « back-fusion ». Les protéines impliquées dans l'entrée du VSV sont écrits en rouge. Les lipides spécifiques des endosomes qui favorisent la fusion de VSV sont inscrits en violet.

2.4.3.b. Le transport de RABV dans l'axone

Dans le cas de RABV, deux voies différentes avaient été proposées pour le transport du virus à travers l'axone jusqu'au soma où la transcription et la réplication ont lieu. Soit la fusion a lieu tôt et la RNP est transportée seule, soit la totalité de la particule virale est transportée à l'intérieur de la vésicule endocytique. Il est maintenant clair que la voie d'entrée prédominante de RABV dans le neurone est la deuxième voie évoquée (Figure 20).

Premièrement, il a été démontré que les lentivirus pseudotypés avec RABV G sont transportés de manière rétrograde et atteignent le système nerveux central après leur sortie du système nerveux périphérique (Mazarakis et al., 2001). Ce qui n'est pas le cas lorsque VSV G est utilisée pour pseudotyper les lentivirus. Cela indique que RABV G permet le transport sur de longues distances le long des axones, contrairement à VSV G, et que, dans le cas d'une infection par RABV, le virion atteint le soma en étant transporté à l'intérieur d'une vésicule endocytaire (Mazarakis et al., 2001).

Par ailleurs, dans des cellules de neuroblastome murin NS20Y, des expériences ont été effectuées avec des particules de RABV doublement marquées par des protéines fluorescentes. L'une des protéines est une eGFP fusionnée à la protéine P de RABV et l'autre est une protéine fluorescente rouge comprenant la partie transmembranaire et cytosolique de RABV G afin que cette sonde rouge soit insérée dans la membrane virale. Ces particules doublement fluorescentes permettent de discriminer si le virus entier ou seulement la RNP est acheminé le long de l'axone. Il apparaît que dans les cellules NS20Y les particules virales de RABV sont transportées sous forme de cargo dans des vésicules lors du transport axonal rétrograde (Klingen et al., 2008). Des observations similaires ont ensuite été faites dans les neurones sensoriels issus des ganglions de la racine dorsale et les motoneurones (Gluska et al., 2014; Piccinotti and Whelan, 2016).

Dans les neurones primaires moteurs et sensoriels, la CME apparaît comme la voie majeure d'endocytose du RABV. Cependant, dans les motoneurones dérivés de la moelle épinière ventrale, une fraction significative des particules entrantes ne sont pas localisées avec la transferrine, ce qui suggère que certains virions entrent indépendamment de la clathrine ou du mécanisme de macropinocytose (Piccinotti and Whelan, 2016).

Le site d'acidification des vésicules contenant le RABV est encore un sujet de débats. Certaines expériences avec la souche vaccinale SAD de RABV ont fourni des preuves du transport des particules virales dans des endosomes acidifiés (Gluska et al., 2014) alors qu'une autre étude réalisée avec un VSV recombinant exprimant la G de la souche CVS a suggéré que l'acidification de la vésicule contenant le virus se produit principalement dans le soma neuronal (Piccinotti and Whelan, 2016) (Figure 20). La capacité à tolérer une acidification légère pendant le transport axonal pourrait être liée aux propriétés intrinsèques de G de différentes souches. En effet les cinétiques de la transition structurale induite par l'abaissement du pH varient de manière significative d'une souche à l'autre (Gaudin et al., 1995b).

Enfin, il convient de noter que certains neurones semblent être résistants à l'infection rétrograde par RABV. C'est le cas de deux classes de neurones sensoriels non myélinisés, qui représentent près de la moitié de la population des neurones ganglionnaires de la racine dorsale qui sont largement résistants à l'infection par le virus de la rage au niveau de la moelle épinière (Albisetti et al., 2017). La résistance de ces neurones à l'infection n'est pas expliquée par une absence des récepteurs potentiels identifiés (Albisetti et al., 2017). Il est donc possible que certaines propriétés structurales encore inconnues des neurones résistants ou de leurs axones empêchent la progression du virus vers le soma.

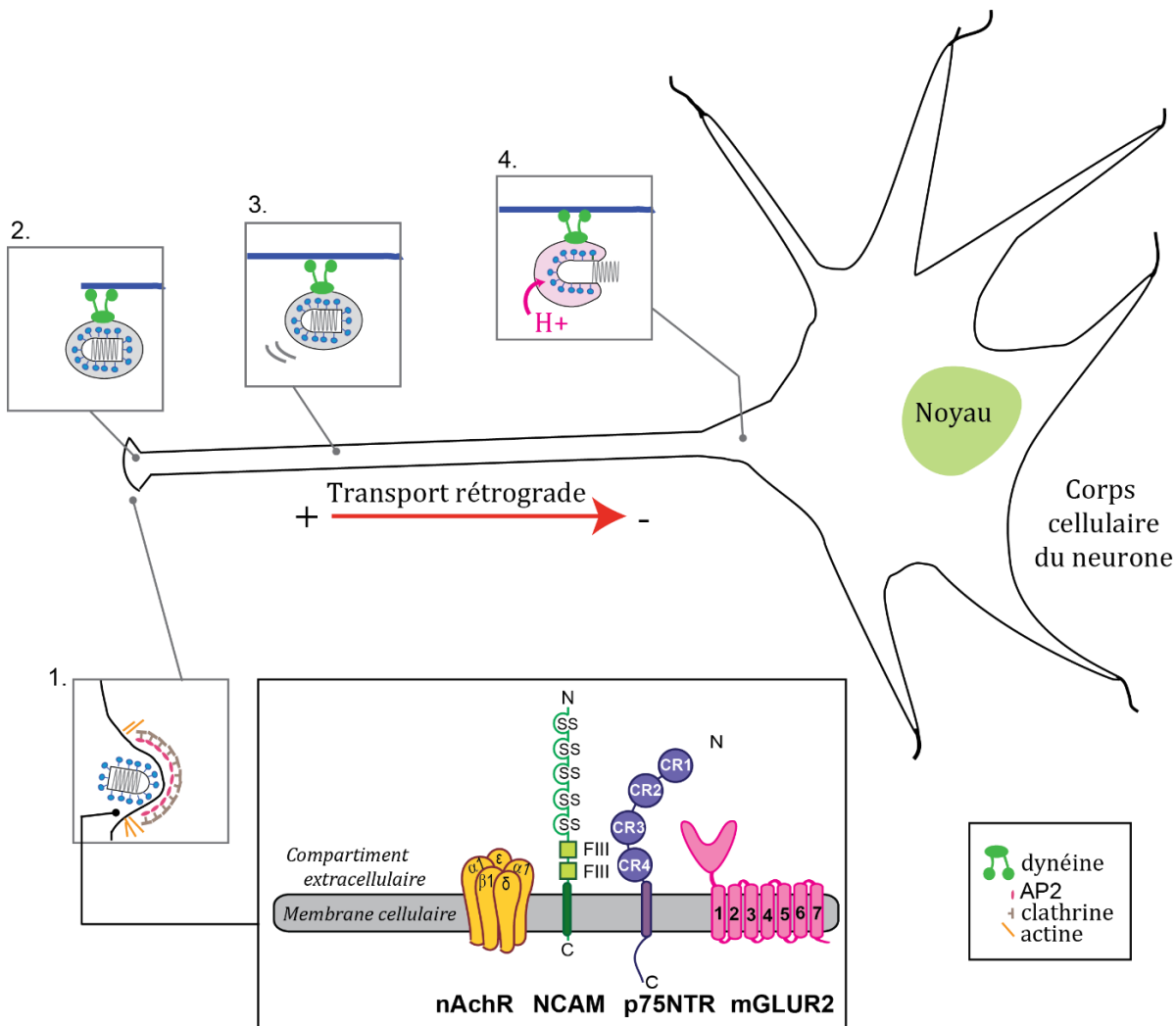


Figure 20. Mécanisme proposé pour l'entrée de RABV et son transport rétrograde dans les neurones.

D'après Belot et al., 2019.

Après la reconnaissance du récepteur, le virion est endocyté dans des vésicules partiellement recouvertes de clathrine (1) et est transporté dans une vésicule endocytique (2) le long de l'axone via les microtubules jusqu'au soma (3). L'acidification des endosomes se produit au niveau du soma, entraînant la fusion membranaire et la libération de la RNP (4).

2.5. La fusion membranaire

Après que le Rhabdovirus ait été internalisé dans un endosome et transporté, les membranes virale et endosomale doivent fusionner, ce qui permet au génome viral d'être relargué dans la cellule pour les étapes ultérieures du cycle.

2.5.1. Considérations générales

Les membranes biologiques constituées de bicouches phospholipidiques et de protéines, et les membranes lipidiques artificielles, sont capables de fusionner. Lors de la fusion, les deux membranes initiales se réunissent pour n'en former qu'une. Ceci se traduit par le mélange des lipides des deux membranes qui fusionnent et par le mélange du contenu des compartiments qu'elles délimitaient.

La déformation des membranes menant à la fusion membranaire est connue au moins dans ses grands principes. Dans un premier temps les membranes se rapprochent localement. Ce rapprochement des membranes crée une distorsion locale qui favorise la formation d'un *stalk* initial (c'est-à-dire une connexion lipidique entre les feuilletts proximaux des membranes). Puis une expansion radiale de ce *stalk* induit la formation d'un diaphragme d'hémifusion défini par une bicouche lipidique formée par les monocouches distales des membranes. Finalement, dans ce diaphragme, il y a la formation d'un pore de nature lipidique (Figure 21) (Chernomordik and Kozlov, 2008) dont l'élargissement conduit à la fusion complète.

Ce modèle est largement validé par des données cristallographiques (Yang et al., 2003) et de microscopie électronique (Erk et al., 1996) qui ont mis en évidence certains de ces états intermédiaires de fusion. Cependant, ce modèle fait encore l'objet d'affinements dans la communauté des physiciens des membranes notamment concernant l'organisation locale précise des lipides dans certains intermédiaires.

La fusion peut survenir spontanément. Les membranes subissent des ondulations et peuvent entrer en collision. Ces chocs tendent à éloigner les deux membranes quand elles sont à courte distance il s'agit de la force d'Helfrich. De plus, la couche d'hydratation doit disparaître. En effet, les molécules d'eau présentes entre les membranes empêchent leur rapprochement. Des liaisons faibles entre l'eau et les têtes polaires des lipides doivent donc être rompues. Ces deux contributions s'opposent au rapprochement des deux membranes et donc à la formation du *stalk*. Par ailleurs, la formation du pore mais surtout son élargissement menant à la fusion complète sont des étapes coûteuses en énergie. Par conséquent, dans les organismes vivants, le processus de fusion est catalysé (la fusion spontanée étant peu efficace), ce qui permet sa régulation spatiale et temporelle et donc évite les phénomènes de fusion indésirables.

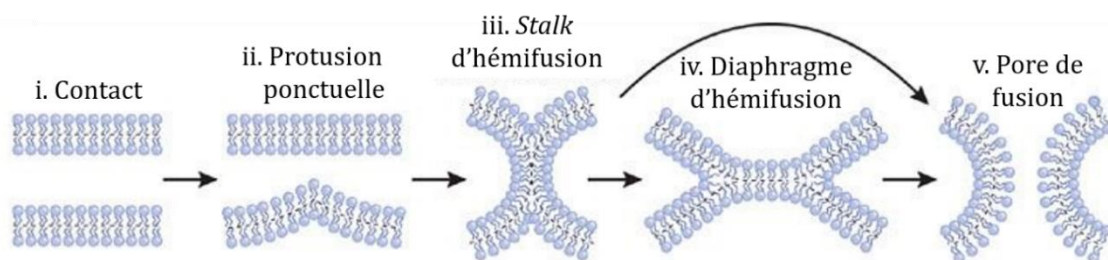


Figure 21. Schéma du processus de fusion membranaire par l'intermédiaire d'un intermédiaire hémifusion.

Adapté de Chernomordik et Kozlov, 2008. (i) Les membranes entrent en contact, (ii) permettant l'apparition d'une protusion membranaire minimisant l'énergie de la répulsion d'hydratation entre les monocouches proximales des membranes entrant en contact (iii) ce qui entraîne l'apparition d'un stalk d'hémifusion avec des lipides de la monocouche proximale qui ont fusionnés et ceux de la monocouche distale non fusionnés. (iv) L'expansion du stalk produit le diaphragme d'hémifusion. (v) Un pore de fusion se forme soit dans la bicouche du diaphragme hémifusion, soit directement à partir du stalk. Les lignes pointillées indiquent les limites des surfaces hydrophobes des monocouches.

Lorsque le processus de fusion est finalement engagé, les configurations des membranes qui émergent aux étapes intermédiaires de la fusion nécessitent un apport d'énergie et représentent donc des barrières énergétiques qui doivent être surmontées. C'est la formation de ces intermédiaires de fusion qui limite largement la vitesse de la réaction de fusion. Les protéines impliquées vont donc catalyser leur formation.

La fusion membranaire a une énergie d'activation estimée à 40kcal/mol (Lee and Lentz, 1998). Cette énergie est idéalement positionnée pour minimiser la fusion spontanée tout en permettant une réaction rapide dépendante des protéines de fusion telles que les protéines

SNARE dans la cellule par exemple (François-Martin et al., 2017), ou par les protéines de fusion virales.

Les protéines de fusion virales subissent toutes une transition structurale favorable, depuis un état pré- vers un état post-fusion, qui va être couplée à la formation des intermédiaires de haute énergie durant la fusion. Cette transition structurale est entraînée par la diminution du pH, ou l'interaction avec des récepteurs cellulaires (Carr et al., 1997; Cohen and Melikyan, 2004; Harrison, 2005).

2.5.2. Propriétés de fusion des Rhabdovirus

La fusion de RABV et de VSV avec des liposomes artificiels (Gaudin, 1996; Gaudin et al., 1991b, 1993, 1995b; Roche et Gaudin, 2004; Roth et Whittaker, 2011; Yamada et Ohnishi, 1986) et avec des cellules (Clague et al., 1990; Puri et al., 1988, 1992) a été largement caractérisée.

De ces études, il apparaît que ni RABV (Gaudin et al., 1991b) ni VSV (Herrmann et al., 1990; Yamada and Ohnishi, 1986) n'ont besoin de lipides spécifiques pour permettre la fusion. Cependant, certains lipides des endosomes tardifs tels que les BMP améliorent la fusion de VSV lorsqu'ils sont présents dans la membrane cible (Roth and Whittaker, 2011).

Il convient de noter que le domaine transmembranaire de VSV G a été démontré comme étant impliqué à certains stades de la transition de l'hémifusion vers une fusion complète (Ci et al., 2018; Cleverley and Lenard, 1998).

La dépendance en pH de la fusion a été caractérisée pour plusieurs Rhabdovirus et est très similaire d'un Rhabdovirus à un autre, étant optimale autour de pH 6 (Clague et al., 1990; Gaudin et al., 1999a, 1999b; Roche and Gaudin, 2004). Pour de nombreux Rhabdovirus, il apparaît que pour un virus donné et ses variants, plus le pH seuil est élevé, plus la virulence est importante (Gaudin et al., 1999a, 1999b).

La préincubation des Rhabdovirus à faible pH en l'absence d'une membrane cible conduit à l'inactivation des propriétés de fusion virale (Clague et al., 1990; Gaudin et al., 1991b). Comme la transition structurale est réversible, la réincubation des virions préalablement acidifiés, à un pH supérieur à 7 permet de récupérer au moins partiellement leur activité de fusion initiale (Gaudin, 2000b; Gaudin et al., 1991b, 1993).

Comme il a déjà été évoqué, la réversibilité du changement de conformation est nécessaire pour permettre aux nouvelles G synthétisées d'être transportées à travers les compartiments acides de l'appareil de Golgi, dans lesquels elles transitent après leur synthèse, vers leur état post-fusion. La réversibilité leur permet de retrouver leur état pré-fusion lorsqu'elles atteignent la surface cellulaire pour être incorporées dans les virions nouvellement synthétisés (Gaudin et al., 1995b).

2.5.3. Les différentes classes de protéines de fusion virales

Les virus enveloppés possèdent des glycoprotéines d'enveloppe qui catalysent la fusion membranaire. Ces protéines de fusion virales sont classées dans trois classes distinctes sur la base de la comparaison de leur structure. Quelle que soit leur classe d'appartenance, les glycoprotéines de fusion semblent catalyser la fusion de façon très semblable (Chernomordik et al., 1998; Gaudin, 2000a; Zaitseva et al., 2005).

La liaison à un récepteur ou l'acidification de l'endosome dans lequel le virus a été internalisé entraîne l'exposition du peptide de fusion ou des boucles de fusion permettant l'interaction

avec la membrane cible (Figure 21, (ii)). Cette interaction déstabilise le feuillet externe de la membrane cellulaire favorisant l'initiation du processus de fusion.

Une perte de l'activité de fusion quand les particules virales sont incubées à pH acide en l'absence de membrane a été démontrée pour les virus fusionnant à bas pH (Bron et al., 1993; Corver et al., 2000; Gaudin et al., 1991b; Stegmann et al., 1987). Cette perte de l'activité de fusion est due au déclenchement de la transition structurale en absence de membrane cible. Cette inactivation est en général irréversible (sauf, nous l'avons vu, pour les Rhabdovirus). Pour les virus fusionnant à bas pH, un second niveau de régulation existe. En effet, durant leur biosynthèse les protéines de fusion virales rencontrent des environnements acides, dans les compartiments du Golgi, ce qui pourrait déclencher des événements de fusion indésirables. De nombreuses protéines fusogènes virales (ou leur protéine partenaire chez les Flavivirus et les Alphavirus) subissent un clivage préparatoire dans le trans-Golgi qui les rend compétentes pour catalyser le processus de fusion. En absence de ce clivage tardif, les protéines fusogènes ne sont pas fonctionnelles : tant que le clivage n'a pas eu lieu, elles ne pourront pas effectuer leur changement de conformation.

2.5.3.a. Les protéines de fusion de classe I

(i) Influenza HA, le prototype des glycoprotéines de fusion de classe I

La première structure cristalline d'un ectodomaine de glycoprotéine de fusion virale qui a été déterminée est celle de l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe, isolée par digestion limitée à la bromélaïne à partir de virions purifiés (Skehel et Wiley, 2000 ; Wilson et al., 1981). HA est synthétisée sous la forme HA0, une molécule précurseur clivée par une protéase cellulaire pour produire HA1, le domaine de liaison à l'acide sialique qui est le récepteur viral, et HA2, le domaine de fusion à ancrage membranaire (Stieneke-Grober et al., 1992). Le clivage de HA0 est nécessaire au changement de conformation fusogénique induit par un faible pH.

Dans sa conformation pré-fusion, HA est un homotrimère, chaque protomère étant constitué d'une chaîne HA1 et d'une chaîne HA2 reliées par un seul pont disulfure. Dans la structure pré-fusion, la majeure partie de HA2 forme un trimère allongé composé de faisceaux d'hélices torsadées (coiled-coil) au sommet duquel HA1 est attaché. L'extrémité N-terminale de HA2, est très hydrophobe et constitue le peptide de fusion qui est enfoui à l'interface trimérique (Figure 22).

Après l'exposition à un faible pH, HA subit une transition structurale importante entraînant la perte de l'interaction entre HA1 et HA2 au sein des protomères et la dissociation de l'interface entre les sous-unités HA1 qui stabilisait la protéine dans sa conformation trimérique pré-fusion. Globalement, le changement de conformation entraîne essentiellement un changement de conformation de HA2, tandis que HA1 conserve sa structure tertiaire (Sauter et al., 1992). Pendant la transition structurale, une boucle de HA2 devient une hélice, ce qui augmente la longueur du faisceau d'hélices central à son extrémité N-terminale (Figure 22). Ce mouvement transfère le peptide de fusion vers le sommet de la protéine, où se trouve la membrane cible. La transition structurale est complétée par un déplacement de l'ancre membranaire C-terminale qui se replie vers l'extrémité N-terminale donnant une forme en épingle à cheveux à HA2 dans laquelle le segment transmembranaire et le peptide de fusion sont à proximité immédiate du même côté de la protéine, ce qui est attendu à la fin du processus de fusion lorsque les membranes virale et endosomale ont fusionné (Figure 22).

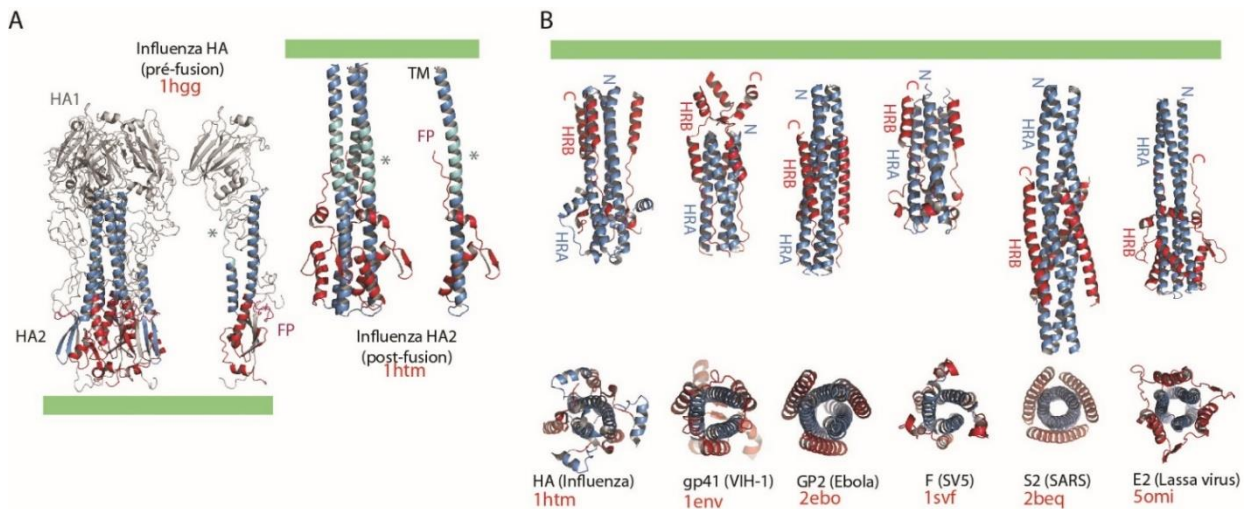


Figure 22. Protéines de fusion de classe I.

A. Structures de l'hémagglutinine de la grippe (HA). Partie gauche : Représentation en ruban du trimère et d'un protomère de HA sous conformation pré-fusion (Wilson et al., 1981). La sous-unité contenant le domaine de liaison à l'acide sialique (HA1) est colorée en gris et la sous-unité de fusion HA2 est colorée en bleu et en rouge. L'extrémité N-terminale de HA2 constitue le peptide de fusion hydrophobe (FP, coloré en magenta) qui est enfoui à l'interface trimérique dans cette conformation. Partie droite : Structure du trimère et du protomère HA2 dans la conformation post-fusion (Chen, Skehel, et Wiley, 1999). Les positions du domaine transmembranaire (TM) et du peptide de fusion (FP) sont indiquées sur le protomère post-fusion. Le segment HA2 qui se replie en une hélice est coloré en cyan dans les deux conformations.

B. Structure des trimères post-fusion de plusieurs protéines de fusion virales de classe I (Chen, Skehel, et Wiley, 1999 ; Weissenhorn et al., 1997 ; Weissenhorn et al., 1998 ; Yin et al., 2006 ; Supekar et al., 2004 ; Zhang et al., 2019). Les vues de dessus et de côté des protéines de fusion de 6 virus différents sont présentées : Le faisceau des hélices torsadées N-terminales est coloré en cyan et le domaine C-terminal qui rejoint le domaine transmembranaire est en rouge. Dans toutes ces structures, la conformation du trimère en épingle à cheveux rapproche les extrémités N- et C-terminales (correspondant respectivement à la position du peptide de fusion et du domaine transmembranaire).

(ii) Caractéristiques communes aux protéines de fusion de classe I

Plusieurs glycoprotéines de fusion présentent des caractéristiques similaires à celles de HA. Ensemble, elles définissent la classe I des glycoprotéines de fusion. Outre HA, cette classe comprend les glycoprotéines de fusion de Paramyxoviridae (Baker, et al., 1999; Yin, et al., 2005, 2006) (par exemple le virus de la rougeole), des Pneumoviridae (par exemple le virus respiratoire syncytial- Jason et al., 2011-), des Retroviridae (par exemple le VIH, - Buzon et al., 2010; Weissenhorn, et al., 1997-), les Filoviridae (par exemple le virus Ebola - Weissenhorn, et al., 1998-), les Arenaviridae (par exemple le virus Lassa – Shulman et al, 2019-) et les Coronaviridae (Duquerroy, et al., 2005; Supekar et al., 2004; Xu et al., 2004) (par exemple le virus du MERS).

Les glycoprotéines de fusion de classe I sont trimériques dans leur conformation pré- et post-fusion. Elles ont un site de clivage interne. Ce clivage est nécessaire pour que la conformation pré-fusion puisse subir la transition structurale fusogénique en réponse à un stimulus déclencheur (bas pH ou interaction avec un récepteur). Le fragment C-terminal transmembranaire résultant du clivage est la sous-unité de fusion (correspondant à HA2 du virus Influenza) qui porte à son extrémité N-terminale ou proche de celle-ci, une région d'environ 15 acides aminés hydrophobes qui constitue le motif d'interaction membranaire.

Sous conformation pré-fusion, les sous-unités N-terminale et C-terminale restent liées par un pont disulfure (comme c'est le cas pour HA) ou par des interactions non covalentes (comme pour la protéine env du VIH). Le peptide de fusion est enfoui dans une interface protéine-protéine.

À l'état post-fusion, la sous-unité de fusion est repliée en un faisceau trimérique d'hélices torsadées, à l'extrémité N-terminale de laquelle se trouvent les trois peptides de fusion, à présent exposés au solvant, et dans les sillons duquel se trouvent, insérées de manière antiparallèles, les segments C-terminaux rejoignant le domaine transmembranaire. Dans cette conformation, la forme du protomère est donc une structure allongée en épingle à cheveux avec le peptide de fusion et le domaine transmembranaire situés à la même extrémité.

La signature des classe I est la présence de répétitions d'heptades dans la séquence d'acides aminés de la glycoprotéine. Ces heptades sont constituées d'un motif répété de sept acides aminés abcdefg où a et d sont des résidus hydrophobes. Une première région constituée de répétitions d'heptades contiguës (nommée HRA ou HR1) est située immédiatement en aval du peptide de fusion et forme le faisceau trimérique central d'hélices torsadées. Il est souvent accompagné d'une seconde région (nommée HRB ou HR2) située dans la partie C-terminale de l'ectodomaine qui constitue les hélices positionnées dans le sillon du faisceau central.

2.5.3.b. Les protéines de fusion de classe II

(i) TBEV E, le prototype des glycoprotéines de fusion de classe II

La glycoprotéine E du virus de l'encéphalite transmise par les tiques (TBEV), membre du genre Flavivirus de la famille des Flaviviridae, est la première glycoprotéine de fusion de classe II pour laquelle une structure cristalline a été résolue (Rey et al., 1995).

La protéine E se replie de manière co-translationnelle en association avec une protéine associée appelée prM (Heinz et al., 1994). L'association hétérodimérique entre E et prM est absolument nécessaire pour le repliement et le transport corrects de E (Sanchez-San Martin et al., 2009). Les virions immatures se forment par bourgeonnement de la capsidie contenant le génome dans la lumière du réticulum endoplasmique. prM et E sont organisés en un réseau icosaédrique à la surface virale. La maturation des virions implique un réarrangement important de leur organisation à la surface des particules. Enfin, le clivage protéolytique de prM dans le réseau trans-Golgi par une protéase, est nécessaire pour que E puisse subir le changement de conformation fusogénique induit par un faible pH (Sanchez-San Martin et al., 2009 ; Bressanelli et al., 2004). Ce clivage activateur est donc nécessaire pour l'infectivité du virion.

E affiche une architecture moléculaire complètement différente de celle de HA et des glycoprotéines de fusion de classe I.

Dans sa conformation pré-fusion, elle forme un dimère antiparallèle allongé, posé à plat à la surface du virus (Figure 23) et organisé en réseau icosaédrique (Rey et al., 1995). La chaîne polypeptidique d'un protomère se replie en des domaines distincts. Le domaine I est un tonneau β . Le domaine II est le domaine de fusion, il est allongé et est impliqué dans la dimérisation de E. Le domaine III est situé dans la partie C-terminale de l'ectodomaine et présente un repliement de type immunoglobuline.

La boucle de fusion interne est située entre deux brins à l'extrémité du domaine de fusion et est enfouie à l'interface dimérique. Lors d'une exposition à faible pH, les dimères se dissocient et les protomères se réassocient dans une structure trimérique. Le changement de

conformation d'un protomère est moins impressionnant que celui observé pour les glycoprotéines de fusion virales de classe I car il y a peu de changement dans les structures secondaire et tertiaire des trois domaines. Néanmoins, les interactions entre les domaines constituant un protomère sont très différentes dans les conformations pré- et post-fusion. En particulier, le domaine III, qui est connecté à la partie C-terminale de la molécule, se déplace d'environ 35Å vers la boucle de fusion (Figure 23). Ce mouvement redirige la chaîne polypeptidique, de sorte que le segment transmembranaire se retrouve situé au voisinage de la boucle de fusion à la même extrémité du trimère, de forme allongée, qui est maintenant perpendiculaire à la membrane (Bressanelli et al., 2004). Par conséquent, malgré l'architecture différente des protéines, la structure post-fusion de E rappelle la structure en épingle à cheveux post-fusion des protéines de fusion de classe I (Figure 23).

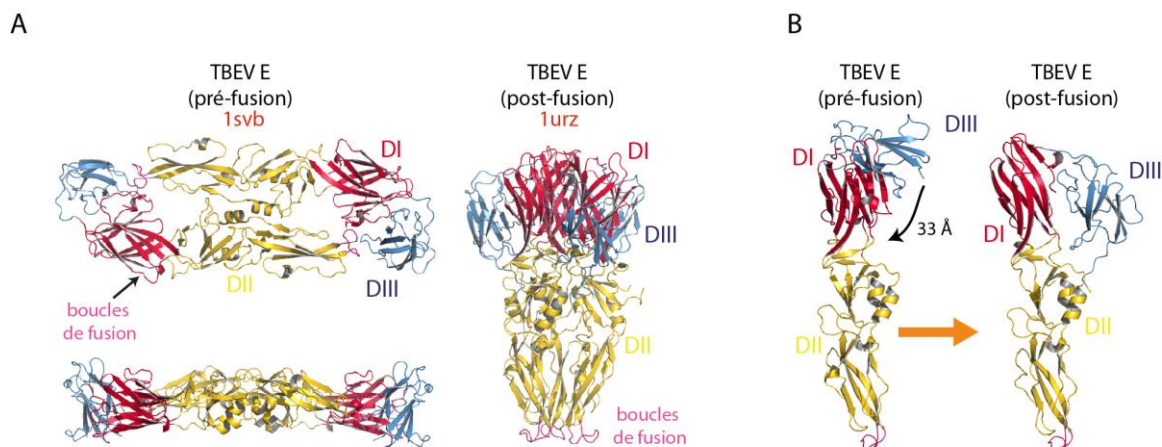


Figure 23. Protéines de fusion de classe II.

A. Représentations en ruban de la conformation dimérique de pré-fusion de TBEV E (à gauche) (Rey et al., 1995) et de sa conformation trimérique post-fusion (à droite) (Bressanelli et al., 2004). **B.** changement conformationnel du protomère TBEV E. La flèche indique le mouvement du domaine III (DIII) vers la boucle de fusion dans le domaine II (DII).

(ii) Caractéristiques communes aux protéines de fusion de classe II

Les autres glycoprotéines de fusion de classe II adoptent une structure très similaire à celle de la glycoprotéine E des Flavivirus. Les glycoprotéines E1 des Alphavirus (incluant les virus de la forêt de Semliki - Lescar et al., 2001- et le Chikungunya -Voss et al., 2010-), du virus de la rubéole (Dubois et al., 2013) et de l'ordre des Bunyavirales (Garry et Garry, 2004) ainsi que la glycoprotéine E du virus de la dengue (Modis et al., 2003) et la glycoprotéine E2 du virus de l'hépatite C (Krey et al., 2010) ont également le même repliement malgré l'absence de similarité de séquence.

Toutes les glycoprotéines de fusion virales de classe II identifiées jusqu'à présent ont la même organisation structurale en trois domaines que TBEV E (Lescar et al., 2001 ; Modis et al., 2003 ; Rey et al., 1995). La région d'interaction de la membrane cible est située à la pointe du domaine de fusion (domaine II). Elle peut être monopartite (portant une seule boucle de fusion) comme c'est le cas pour TBEV E, bipartite (portant deux boucles de fusion) comme c'est le cas pour la glycoprotéine E1 du virus de la rubéole, ou tripartite dans le cas de la glycoprotéine Gc des hantavirus. Dans la conformation pré-fusion, les boucles de fusion sont généralement enfouies au niveau d'une interface dimérique.

Les glycoprotéines de fusion virale de classe II sont synthétisées et repliées en tant que complexe avec une seconde protéine d'enveloppe virale (prM pour les Flavivirus, E2 pour les Alphavirus, Gn pour les Bunyavirus) jouant un rôle de chaperon (Heinz et al., 1994 ; Li et al.,

2008). Le clivage protéolytique de cette protéine accompagnatrice prépare la glycoprotéine de fusion de sorte qu'elle soit capable de subir la transition structurale fusogénique induite à bas pH (Bressanelli et al., 2004 ; Gibbons et al., 2004 ; Modis et al., 2004). Dans leur conformation native, elles forment des homo-(pour les Flavivirus et Phenuiviridae) ou hétéro-(pour les Alphavirus) dimères posés à plat à la surface du virus (Li et al., 2008 ; Rey et al., 1995) mais également parfois des trimères (pour les Peribunyaviridae) à organisation tripodale.

Dans la plupart des cas, dans leur état pré-fusion, les glycoprotéines de fusion de classe II sont organisées en un assemblage icosaédrique à la surface virale (Kuhn et al., 2002 ; Lescar et al., 2001).

Enfin, lors d'une exposition à bas pH, les oligomères pré-fusion de classe II se dissocient et les sous-unités se réassocient dans une structure trimérique. Dans cette conformation, les boucles de fusion et les domaines transmembranaires sont situés à la même extrémité d'une molécule allongée qui est positionnée de façon perpendiculaire à la membrane (Li et al., 2008), ce qui est réminiscent de l'organisation finale de la sous-unité de fusion des glycoprotéines de classe I.

2.5.3.c. Les protéines de fusion de classe III

(i) VSV G, le prototype des glycoprotéines de fusion de classe III

La troisième classe de protéines de fusion a été identifiée lors de la détermination de la structure des ectodomains des glycoprotéines fusogènes G du VSV (Roche et al., 2006,2007) et de la glycoprotéine B (gB) du virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1) (Heldwein et al., 2006). Leur comparaison a révélé une homologie imprévue entre les deux protéines, pour laquelle aucune similarité de séquence n'avait été détectée auparavant.

Les structures de la glycoprotéine du VSV ont été déjà décrites en Figure 15. On notera que l'organisation du domaine de fusion de G rappelle celui des glycoprotéines de classe II. Les similitudes incluent une structure étendue en feuillets β dont un très allongé constitué de trois brins à l'extrémité desquels sont situés les deux boucles de fusion. Par ailleurs, le cœur de la structure post-fusion est organisé en un faisceau de six hélices qui ressemble à celui de la structure post-fusion des glycoprotéines de classe I (Roche et al. 2008).

(ii) Caractéristiques communes aux protéines de fusion de classe III

Outre VSV G et HSV-1 gB, les glycoprotéines de fusion d'autres herpesvirus (y compris le virus Epstein-Barr - EBV - [Backovic et al., 2009] et le cytomégalovirus - CMV -) et de tous les Rhabdovirus appartiennent également à la classe III des glycoprotéines de fusion. La glycoprotéine gp64 du baculovirus s'est également révélée être une glycoprotéine de fusion de classe III (Kadlec et al., 2008). Sur la base de comparaisons de séquences, il semble qu'il en soit de même pour la glycoprotéine de bornavirus (Gary et Gary et al., 2009).

Toutes les glycoprotéines de fusion virales de classe III identifiées jusqu'à présent sont homologues et ont la même organisation en domaine que VSV G (Roche et al., 2006). Et, bien que nous ne connaissions pas la structure de la conformation pré-fusion d'autres glycoprotéines de fusion de classe III, des enveloppes à basse résolution de la glycoprotéine gB de plusieurs herpesvirus dans leur état de pré-fusion putatif ont été obtenues par cryotomographie (Zeev-Ben-Mordehai et al., 2016). Elles suggèrent fortement que l'état pré-fusion de ces protéines a une organisation structurale similaire à celle de VSV G.

2.5.4. Mécanisme de la fusion membranaire induite par les Rhabdovirus

2.5.4.a. Une coopérativité nécessaire

L'existence d'un équilibre dépendant du pH entre les différents états de G des Rhabdovirus indique que, contrairement aux autres glycoprotéines de fusion virales, la conformation native n'est pas métastable. En général, il est proposé que la grande quantité d'énergie libérée lors du changement de conformation de l'état pré-fusion métastable à l'état de post-fusion stable final est utilisée pour former les intermédiaires lipidiques de haute énergie pendant la réaction de fusion (Carr et al., 1997; Harrison, 2015). Dans le cas des Rhabdovirus, la quantité d'énergie libérée lors de la transition structurale d'un seul trimère de G est petite par rapport à celle libérée par les glycoprotéines de fusion ayant un état natif métastable telle que HA et par rapport à la barrière d'énergie de la réaction de fusion (Kuzmin et al., 2001; Lee et Lentz, 1998). Par conséquent, une action concertée de plusieurs trimères de G est nécessaire pour surmonter cette barrière énergétique. Pour RABV, le nombre de trimères nécessaire pour la réaction de fusion a été estimée à environ 15 (Roche et Gaudin, 2002).

2.5.4.b. Piégeage d'intermédiaires durant le processus de fusion

Dans le cas du RABV, l'incubation du virus en présence de liposomes permet d'observer un temps de latence avant l'achèvement du processus de fusion signifiant que la fusion est un processus comportant au moins deux étapes cinétiquement limitantes. Ce temps de latence diminue quand le pH diminue ou que la température augmente (Clague et al., 1990; Gaudin et al., 1991b, 1993). L'utilisation de LPCs à chaînes courtes, capables de se transloquer à travers la membrane, permet de supprimer ce temps de latence montrant qu'il correspond à une étape de réarrangement des membranes, impliquant les feuillettes internes. Cette étape pourrait donc correspondre à la formation ou à l'élargissement du pore de fusion (Gaudin, 2000b). Le processus de fusion peut être arrêté à pH 6,4 et 4°C et un intermédiaire peut être piégé. Lorsqu'à partir de cet état le processus de fusion est déclenché en augmentant la température, on observe qu'il est fortement accéléré (Gaudin et al., 1993). L'ensemble des données expérimentales suggère que l'intermédiaire piégé pourrait correspondre à la formation du pore de fusion initial qui ne pourrait pas s'élargir à la température de 4°C (Gaudin, 2000b).

Dans le cas de VSV, la microscopie électronique a révélé que la fusion de particules virales avec des liposomes se produit préférentiellement à la base plate du virion (Libersou et al., 2010). Dans ce contexte expérimental, la voie de fusion de VSV semble impliquer deux étapes distinctes. La première étape se produit à la base plate et implique des déformations locales de la membrane, conduisant probablement à la formation d'un ou plusieurs *stalk*, et d'un ou plusieurs pores de fusion. A partir de simulations de données cinétiques d'hémifusion, le nombre critique de trimères de G nécessaire à ce stade a été estimé entre 3 et 5 (Kim et al., 2017). Ensuite, la formation d'un réseau hélicoïdal de glycoprotéines en dehors de la zone de contact, sur la partie cylindrique du virion, conduirait à l'élargissement de ces pores initiaux, complétant la fusion des membranes (Libersou et al., 2010). La formation de réseau implique des interactions latérales favorables entre glycoprotéines, dans leur conformation à faible pH, c'est ce qui permet probablement de surmonter la dernière barrière d'énergie avant la fusion complète.

2.5.4.c. Fonctionnement de la machinerie de fusion des Rhabdovirus

(i) Interaction des boucles de fusion avec la membrane cible

Le domaine de fusion est le domaine le plus conservé au niveau de sa séquence en acides aminés parmi les glycoprotéines de classe III (Baquero et al., 2015a). Nous l'avons vu, il est formé d'un feuillet β composé de trois brins à l'extrémité desquels se trouvent deux boucles hydrophobes qui interagissent avec la membrane cible (et peut-être aussi avec la membrane virale dans la forme pré-fusion) (Figure 15 D). Ces boucles de fusion contiennent les motifs d'interaction avec la membrane comme il a été montré par des travaux de mutagenèse réalisés sur VSV (Stanifer et al., 2011; Sun et al., 2008). Un alignement des séquences d'acides aminés de plusieurs glycoprotéines de Rhabdovirus révèle que ces boucles contiennent toujours des résidus aromatiques polaires (tryptophanes et tyrosines) (Roche et al., 2008). Par ailleurs, la présence de résidus chargés à proximité des boucles de fusion exclut toute possibilité de pénétration profonde à l'intérieur de la membrane (Figure 15 D). Les tryptophanes et tyrosines sont connus pour se positionner à l'interface entre les chaînes d'acide gras et les têtes des lipides (Wimley and White, 1992). Leur insertion va perturber la monocouche externe de la membrane cible. Cette interaction pourrait conduire à la formation de protrusions lipidiques ponctuelles qui pourraient faciliter la formation du *stalk* (Efrat et al., 2007).

(ii) Interrupteurs sensibles au pH

Les acides aminés jouant un rôle important lors de la transition structurale ont été identifiés. Dans le cas de la G des Vesiculovirus, dans la structure pré-fusion, un groupe de quatre histidines en position 60 et 162 dans le domaine de fusion et 407 et 409 dans le fragment R5, dont certaines sont conservées dans la famille des Rhabdovirus, a été proposé pour jouer le rôle de commutateur sensible au pH déclenchant la transition vers la forme post-fusion (Figure 24 A). La protonation de ces histidines ($pK_a \sim 6,5$) conduit en effet à un regroupement de charges positives induisant une force répulsive entre le domaine de fusion et la partie C-terminale de l'ectodomaine de G (le segment R5) (Roche et al., 2007). Ce rôle des histidines est compatible avec le fait que le diéthylpyrocarbonate, un réactif modifiant spécifiquement ces résidus, inhibe la fusion du VSV (Carneiro et al., 2003).

Par ailleurs, dans la structure post-fusion de VSV G, il existe des regroupement de résidus acides au niveau du fagot des six hélices constituant le cœur de la conformation post-fusion (Figure 24 B). Il avait été proposé que leur déprotonation à pH élevé déstabilise ce domaine central et, par conséquent, permet à G de retourner vers sa conformation pré-fusion. Ceci a été validé par une analyse par mutagenèse qui a démontré que les trois résidus aspartate en position 268, enfouis et pointant l'un vers l'autre au centre de l'environnement hydrophobe de l'interface trimérique post-fusion, constituent le principal commutateur de la transition structurale de la forme post-fusion vers la forme pré-fusion. Les aspartates 274, 393 et 395 ont quant à eux, des contributions supplémentaires (Ferlin et al., 2014). Le résidu aspartate 268 n'est pas conservé chez CHAV. Pour CHAV G, le retour à l'état de pré-fusion, implique d'autres résidus acides dont la déprotonation à pH élevé déstabilise également la structure post-fusion de CHAV G (Baquero et al., 2015b). Il est à noter que les régions correspondant aux segments R4 et R5 dans d'autres glycoprotéines de Rhabdovirus sont souvent enrichies en résidus acides donc certains doivent jouer un rôle similaire de commutateur sensible au pH.

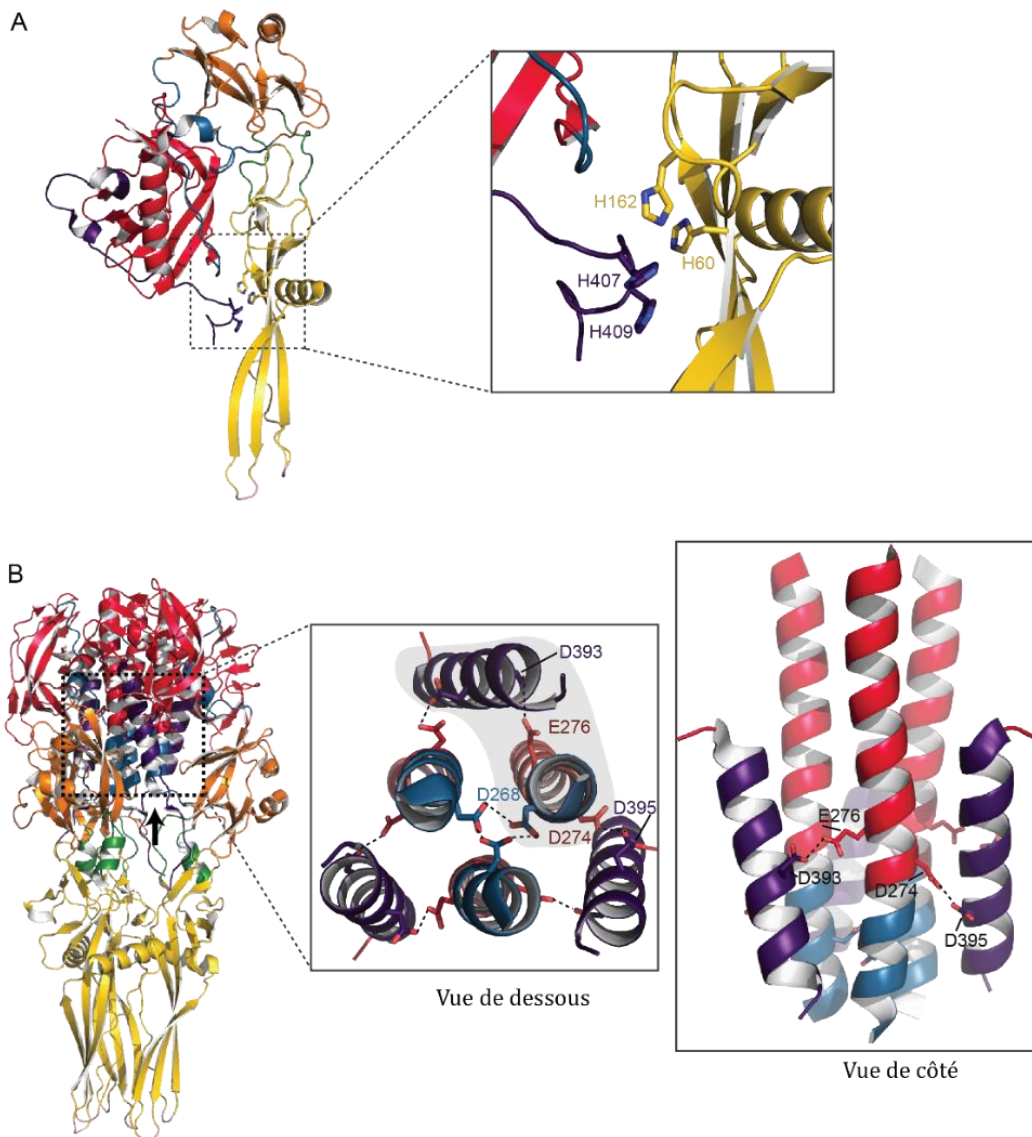


Figure 24. Les éléments interrupteurs sensibles au pH.

A. Vue rapprochée sur le groupe d'histidines (représenté en bâtons) dans la structure du protomère pré-fusion de la G de VSV. **B.** Vue rapprochée sur les acides aminés acides enfouis dans le faisceau de six hélices de la conformation post-fusion. Les liaisons hydrogènes entre les chaînes latérales sous leurs forme protonées sont indiquées. La flèche noire sur la structure trimérique indique la position de l'observateur pour la vue de dessous. Dans la vue de dessous, les hélices appartenant au même protomère sont entourés d'un fond gris. Les atomes d'oxygène sont en rouge et les atomes d'azote en bleu.

(iii) Intermédiaires structuraux durant la transition structurale de G

La transition structurale de G_{th} (l'ectodomaine soluble de G) induite à bas pH, a été caractérisée en solution par l'utilisation combinée de plusieurs techniques biophysiques. La forme trimérique post-fusion de G_{th} est bien la principale espèce détectée en solution dès que le pH est inférieur à 6,7. En revanche, le trimère pré-fusion n'est jamais observé en solution (Albertini et al., 2012) même à très haute concentration, en accord avec des études antérieures réalisées sur une forme soluble obtenue après traitement des particules virales avec la cathepsine D (Crimmins et al., 1983) mais aussi sur une forme complète de G solubilisée par un détergent (Doms et al., 1987). En fait, au-dessus de pH 7, G_{th} semble être un monomère flexible présent sous plusieurs conformations. L'équilibre entre ces formes monomériques dépend du pH, et est déplacé vers des conformations plus allongées quand le

pH diminue (i.e. s'approche de 7) (Albertini et al., 2012). Les analyses de la structure des G des Vésiculovirus à la surface des particules virale par microscopie électronique et par tomographie donnent des résultats similaires. Au dessous de pH 6, la seule structure observée dans la membrane virale est le trimère post-fusion qui tend à se réorganiser en réseaux hélicoïdaux (Libersou et al., 2010).

A un pH supérieur à 7, bien que des trimères pré-fusion soient observés (Libersou et al., 2010), la majorité des glycoprotéines sont sous la forme de monomères flexibles (Albertini et al., 2012). À pH intermédiaires (entre 6,5 et 7), la conformation des glycoprotéines n'est pas homogène et plusieurs conformations de G sont observées (Albertini et al., 2012). Dans certaines régions, on constate une cohabitation de formes monomériques et de formes typiques de la structure trimérique post-fusion. Certaines structures monomériques sont plus allongées que les protomères pré-fusion (Albertini et al., 2012; Baquero et al., 2017). L'apparition séquentielle de ces espèces lors de l'abaissement du pH suggère que la transition structurale de VSV G implique des intermédiaires monomériques.

Récemment, une forme cristalline de CHAV G_{th} a été obtenue. Elle contenait quatre molécules dans l'unité asymétrique, adoptant deux conformations différentes et distinctes des protomères pré- et post-fusion (Baquero et al., 2017) (Figure 25).

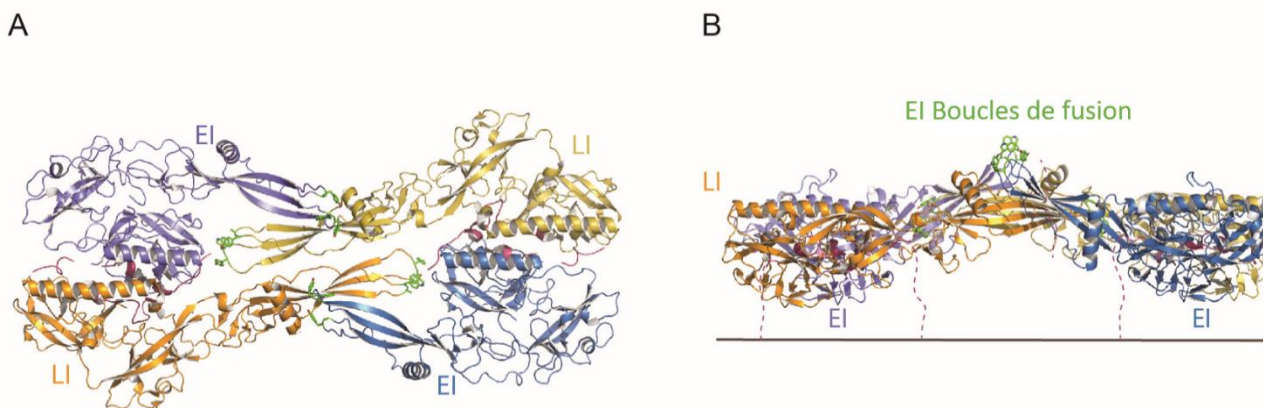


Figure 25. Structure de CHAV G_{th} dans l'unité asymétrique du cristal.

Vues de dessus A, et latérale B, de l'assemblage tétramérique dans le cristal CHAV G_{th} (PDB: 5MDM). Les protomères sous conformation EI sont dans les tons bleus. Ceux sous conformation LI sont dans les tons jaunes. Les résidus des boucles de fusion sont en verts. En (B), les segments C-terminaux reliant la protéine à la membrane sont représentés en traits pointillés et la position de la membrane est indiqué par la ligne noire.

La première conformation ressemble au protomère pré-fusion de VSV G avec une seule différence aux conséquences majeures : le segment R5 a déjà quitté le sillon hydrophobe qu'il occupe dans la conformation pré-fusion. Cette conformation de CHAV G_{th} correspond donc à un intermédiaire précoce (EI pour early intermediate) de la transition structurale.

En revanche, la seconde conformation de CHAV G_{th} dans le cristal correspond à un intermédiaire plus tardif (LI pour late intermediate). Il est déjà dans une conformation en épingle à cheveux allongée bien que le repliement des segments R1, R4 et R5 soit encore incomplet. Ces deux structures suggèrent une voie plausible pour le changement de conformation de la G des Rhabdovirus qui est détaillée en Figure 26. Dans ce modèle, la quasi-totalité de la transition structurale s'effectue alors que G est monomérique et la trimérisation vers la forme post-fusion est une étape très tardive.

(iv) Rôle éventuel de dimères (voire de tétramères) dans la fusion des Vésiculovirus.

Dans la structure cristalline, deux molécules de CHAV G_{th} sous conformation EI et deux molécules G_{th} sous conformation LI sont assemblées dans un tétramère compact qui forme une structure plate (Figure 27) au sommet de laquelle les boucles de fusion des deux G dans la conformation EI sont exposées (Baquero et al., 2017) (Figure 27,B). Si une telle structure se forme au niveau de la surface virale, son orientation placerait de manière optimale ces deux boucles pour attaquer la membrane cible.

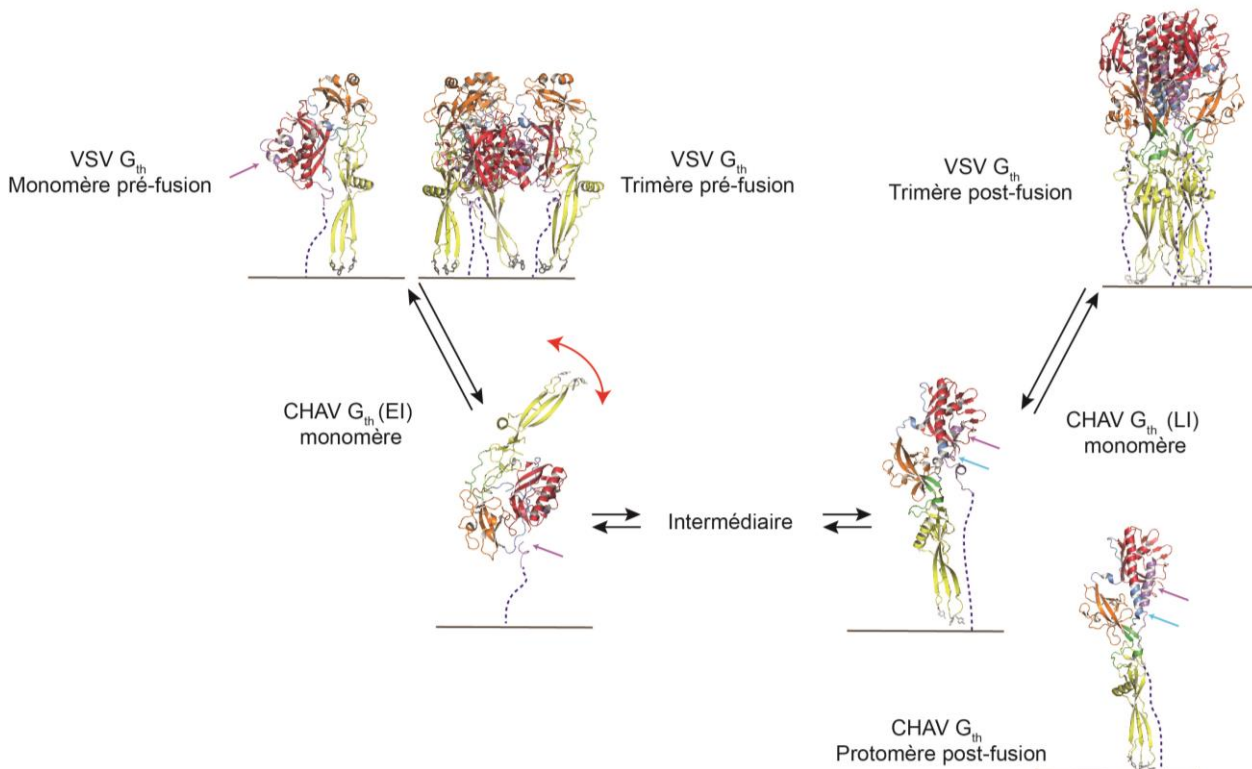


Figure 26. Voie plausible du changement de conformation des Vésiculovirus G.

Le trimère pré-fusion de VSV G se dissocie en monomères. Le segment R5 (indiqué par des flèches violettes) quitte le sillon hydrophobe qu'il occupait dans la conformation pré-fusion pour former l'état intermédiaire précoce (EI). Cela confère une mobilité d'orientation au reste de la molécule, même en l'absence de tout autre changement de conformation. Le repliement de R2 et R3 est partiel. Le repliement de R1, R4 et R5 conduit à la formation de l'état intermédiaire tardif (LI) qui ressemble au protomère post-fusion et est déjà sous une conformation en épingle à cheveux allongée. Le repliement final de R1, R4 et R5 est requis pour la re-trimérisation en conformation post-fusion. Les structures cristallines de G sont représentées sous forme de diagrammes en ruban avec le même code couleur que dans la figure 15.

Dans cet arrangement tétramérique cristallin, les domaines de fusion sont associés de manière antiparallèle et stabilisés par la formation d'un feuillet β intermoléculaire entre deux domaines de fusion, l'un appartenant à une G dans la conformation EI et l'autre dans une G dans la conformation LI. Ce feuillet antiparallèle formé par EI et LI implique les résidus 75 à 80 dans le brin de EI, en aval de la première boucle de fusion et les résidus 120–125 dans le brin de LI, en aval de la seconde boucle de fusion (Figure 27).

Des phénotypes de certains mutants qui n'étaient pas expliqués par les structures cristallines des formes pré- et post-fusion, sont beaucoup plus facilement interprétables dans le contexte de cette nouvelle structure. Ainsi, il avait été montré que les mutations des résidus D121 et E123 affectent les propriétés de fusion de VSV G (Fredericksen et Whitt, 1996) et celles de

VHSV (Gaudin et al., 1999a). Il se trouve que ces deux résidus acides sont situés dans le brin 120-125 de LI et forment un pont salin avec l'histidine 80 située sur le brin du côté EI. Cette histidine est largement conservée chez les Rhabdovirus.

La mutation H80A tout comme la double mutation D121L/E123L, abolissent les propriétés de fusion de VSV G. Dans les deux cas, celles-ci sont restaurées par la même mutation compensatrice Q112P. Dans le domaine de fusion, le résidu 112 est situé du côté opposé des résidus 121 et 123 sur le feuillet β et en est donc éloigné. Cependant, dans la structure tétramérique de CHAV G_{th} du cristal, le résidu 112 est proche des résidus 121, 123 et H80 du même côté du feuillet β intermoléculaire (Baquero et al., 2017) (Figure 27).

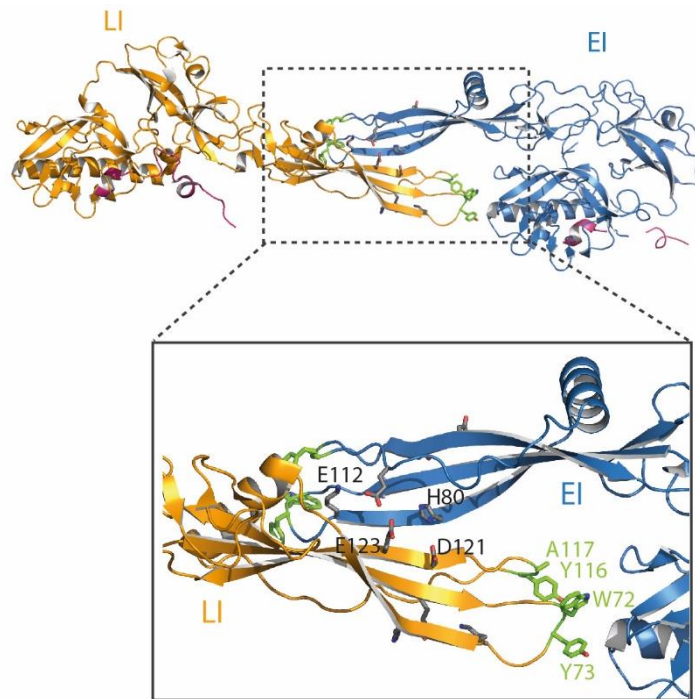


Figure 27. Dimère de G de CHAV.

Association non trimérique des états intermédiaires monomériques de G. En dessous la vue rapprochée du feuillet β antiparallèle formé entre les domaines de fusion de l'EI (en bleu) et LI (en jaune) au sein de l'unité asymétrique du cristal de CHAV G_{th} . Les résidus clés qui se regroupent à l'interface sont représentés en gris. Les résidus des boucles de fusion à la pointe du FD sont en verts. Les atomes d'oxygène sont en rouge et les atomes d'azote en bleu.

Ceci suggère fortement que l'assemblage antiparallèle des domaines de fusion trouvé dans le cristal de CHAV G_{th} est pertinent pour la fusion des Vésiculovirus. Une telle interaction pourrait faciliter l'insertion des boucles de fusion d'un protomère dans la membrane cible tandis que les boucles de fusion du second protomère attaquaient la bicouche lipidique virale.

3. Antigénicité des Rhabdovirus

3.1. Anticorps et réponse immunitaire

La production d'anticorps résulte d'une réponse immunitaire de l'organisme, la réponse immunitaire adaptative dite à médiation humorale puisqu'elle est médiée par les anticorps se trouvant dans le sérum qui était autrefois appelée humeur.

Au cours d'une infection, le virus se répand dans l'organisme et rencontre des lymphocytes B capables de reconnaître un antigène de surface sur le virus. Un même virus peut être reconnu par différents lymphocytes B et ainsi créer une réponse humorale qui va cibler des antigènes de surface distincts ou des régions distinctes d'une même protéine virale. La région de reconnaissance de l'antigène par un anticorps donné est appelée épitope. Il arrive qu'un grand nombre d'anticorps monoclonaux distincts reconnaissent des épitopes très proches à la surface de l'antigène. Cet ensemble d'épitopes localisés dans la même région de la protéine va constituer un site antigénique.

3.2. Les sites antigéniques

La glycoprotéine des Rhabdovirus est la seule protéine virale ayant un domaine externe, c'est donc G qui est la cible des anticorps neutralisants. Son antigénicité a essentiellement été étudiée chez RABV et VSV.

3.2.1. Méthodes d'étude des épitopes et des sites antigéniques

3.2.1.a. Les anticorps utilisés

Pour caractériser les sites antigéniques, on utilise essentiellement des anticorps monoclonaux. Un anticorps monoclonal provient d'un clone de lymphocyte B et reconnaît donc un unique épitope sur un antigène donné.

La réponse anticorps est par essence polyclonale, c'est-à-dire qu'elle implique la reconnaissance de multiples sites antigéniques par différents anticorps, ce qui interdit l'utilisation des sérums polyclonaux pour réaliser une cartographie épitopique fine d'un antigène, d'où le recours à des anticorps monoclonaux caractérisés par la reconnaissance d'un motif unique.

Des hybridomes et des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre VSV G ou RABV G sont commercialisés.

3.2.1.b. Le modèle d'étude viral

Pour étudier l'antigénicité des Rhabdovirus, plusieurs techniques ont été couramment utilisées. Les principales d'entre elles vont être décrites dans les paragraphes qui suivent.

(i) Sélection de mutants d'échappement

L'approche classique de sélection de mutants d'échappement à un anticorps monoclonal donné consiste à incuber les virus avec la dose minimale d'anticorps permettant de neutraliser complètement l'infection virale. La population virale ainsi neutralisée est ensuite mise au contact de cellules sensibles à l'infection. Les virus qui réussissent à infecter les cellules hôtes, sont prélevés et amplifiés en présence de ce même anticorps. Le gène de la glycoprotéine est alors séquencé, et la mutation permettant l'échappement, identifiée. La

répétition de ces expériences avec un même anticorps monoclonal peut permettre d'identifier des mutations d'échappement différentes conduisant ainsi à la caractérisation de son épitope. Lorsqu'on répète ces expériences avec un panel d'anticorps monoclonaux distincts, on peut identifier les sites antigéniques de la glycoprotéine.

Ainsi, des sélections de mutants d'échappement avec des panels d'anticorps ont été utilisées pour définir les principaux sites antigéniques de la glycoprotéine de certains Rhabdovirus (Bakker et al., 2005; Benmansour et al., 1991; Cybinski et al., 1998; Fallahi et al., 2016; Flamand et al., 1993; Huang et al., 1996; Lefrancois and Lyles, 1982a, 1983; Marissen et al., 2005; Prehaud et al., 1988; Raux et al., 1995; Seif et al., 1985; Vandepol et al., 1986).

(ii) Utilisation de mutants de délétion, de chimères ou bien ponctuels

Une autre stratégie employée est d'utiliser des glycoprotéines mutantes ayant des délétions, des troncatures, ou bien encore des chimères de différentes glycoprotéines proches (Keil and Wagner, 1989; Ni et al., 1995). Il est possible également de produire des protéines avec une mutation ponctuelle en alanine, et ce pour toutes les positions de la protéine (Cai et al., 2010; Chao et al., 2017; Marissen et al., 2005). La fixation d'anticorps peut alors être testée sur ces différentes constructions.

L'interprétation de ces résultats est complexe. Il faut en particulier être en mesure de vérifier le bon repliement de la protéine avant de conclure qu'une mutation se traduisant par une absence de reconnaissance par un anticorps monoclonal est bien localisée dans l'épitope.

(iii) Alignement de séquences

Les épitopes de G peuvent être parfois prédits directement *in silico* (Pavitrakar et al., 2018). Ces prédictions peuvent s'appuyer sur des expériences de neutralisation de plusieurs souches virales par un même anticorps. Si certaines de ces souches échappent à la neutralisation, un alignement des séquences permet de mettre en évidence les résidus différents qui sont potentiellement à l'origine de l'échappement à la neutralisation (Kankanamge et al., 2003; Sun et al., 2017).

(iv) Génération de fragments chevauchants

Des épitopes linéaires peuvent être cartographiés en générant des fragments chevauchants couvrant la séquence entière de l'ectodomaine de la G. L'interaction avec des anticorps est ensuite testée classiquement en ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (Fernandez-Alonso et al., 1998; Lafay et al., 1996; Lee et al., 2018; Mansfield et al., 2004; Marissen et al., 2005; Xu et al., 2014).

3.2.2. Les sites antigéniques de RABV G

La structure antigénique de RABV G est la mieux connue des glycoprotéines de Rhabdovirus. Des centaines d'anticorps monoclonaux ont été utilisés pour la caractériser (Benmansour et al., 1991; Lafon et al., 1983; Prehaud et al., 1988; Raux et al., 1995; Seif et al., 1985). La plupart des anticorps liant G sous sa forme native sont neutralisants (Luo et al., 1998). La neutralisation dépend essentiellement du nombre d'anticorps liés par virus (Flamand et al., 1993; Raux et al., 1995), et est donc majoritairement due à l'encombrement stérique conduisant au blocage du site de reconnaissance du récepteur viral ou à l'inhibition du mécanisme de fusion (Flamand et al., 1993), notamment en empêchant le changement de conformation de la protéine.

Deux sites antigéniques majeurs ont été décrits, ce sont les site II et III (Figure 28).

Le site II est reconnu par environ 70% des anticorps monoclonaux testés. Il est discontinu, donc correspond à un site antigénique conformationnel, qui est proche dans l'espace grâce à un pont disulfure (Prehaud et al., 1988). Il comprend les résidus 34-42 (site IIb) et 198-200 (site IIa) (Benmansour et al., 1991; Prehaud et al., 1988). Les résidus qui le constituent sont conservés chez les différentes souches de RABV mais assez peu au sein du genre *Lyssavirus*. L'alignement de sa séquence sur la séquence et structure de VSV G sous sa conformation pré-fusion a permis de montrer qu'il se situe au niveau du domaine d'homologie à la pleckstrine (Figure 28).

Le site III est un site antigénique conformationnel se situant entre les résidus 330 à 338 (Benmansour et al., 1991; Evans et al., 2012; Seif et al., 1985).

Les mutants de RABV résistants à la neutralisation des anticorps monoclonaux présentent souvent une pathogénicité réduite chez la souris (Fallahi et al., 2016; Prehaud et al., 1988; Seif et al., 1985). C'est en particulier le cas de certains mutants d'échappement aux anticorps monoclonaux dirigés contre le site III qui ont un phénotype avirulent mais peuvent se propager en culture cellulaire (Coulon et al., 1998; Seif et al., 1985; Tuffereau et al., 1989). C'est le cas lorsque l'arginine 333 est remplacée par tout autre acide aminé qu'une lysine. Un résidu chargé positivement en 333 est en effet essentiel pour la pathogénicité chez les souris adultes (Coulon et al., 1983; Dietzschold et al., 1983; Tuffereau et al., 1989) (Takayama-Ito et al., 2006; Tao et al., 2010). Une arginine ou une lysine est d'ailleurs conservée en cette position chez les virus rabiques sauvage (non adapté à la culture cellulaire).

Il existe également des sites antigéniques minoritaires reconnus par un petit nombre d'anticorps monoclonaux (Dietzschold et al., 1990; Lafay et al., 1996). Le site minoritaire *a* comprend les deux résidus 342 et 343 (Benmansour et al., 1991). Il semble indépendant du site majeur III malgré sa proximité (Figure 28) (Benmansour et al., 1991; Evans et al., 2012).

Le site antigénique I, appelé ainsi pour des raisons de chronologie, est composé par les résidus 226 à 281 (Benmansour et al., 1991; Marissen et al., 2005). Il est conservé chez les différentes souches de RABV mais l'est moins parmi les autres lyssavirus. Le site IV aussi appelé G5 comprend les résidus 263 et 264 (Cai et al., 2010; Evans et al., 2012; Lafay et al., 1996; Ni et al., 1995). Il semble moins accessible si on le replace sur la structure pré-fusion de VSV.

Des épitopes à des positions isolées parfois souche-dépendant ont aussi été identifiés (Benmansour et al., 1991; Dietzschold et al., 1990; Lafay et al., 1996; Lafon et al., 1983; Raux et al., 1995). C'est le cas de l'épitope allant des résidus 256 à 271 qui est reconnu par l'anticorps 17D2.

Certains anticorps ne sont capables de reconnaître les épitopes que lorsque la G est sous sa conformation pré-fusion et d'autres seulement lorsque G est sous sa conformation post-fusion (Gaudin, 1996). De façon générale, les anticorps dirigés contre les sites antigéniques conformationnels tels que ceux reconnaissant les sites II et III, ne sont capable d'interagir avec la protéine que sous sa forme pré-fusion (Gaudin, 1996). Des résidus présents au niveau N-terminal de la protéine comme les résidus 10, 13 et 15 constituent un épitope qui n'est reconnu que lorsque G est sous sa conformation post-fusion (Gaudin, 1996).

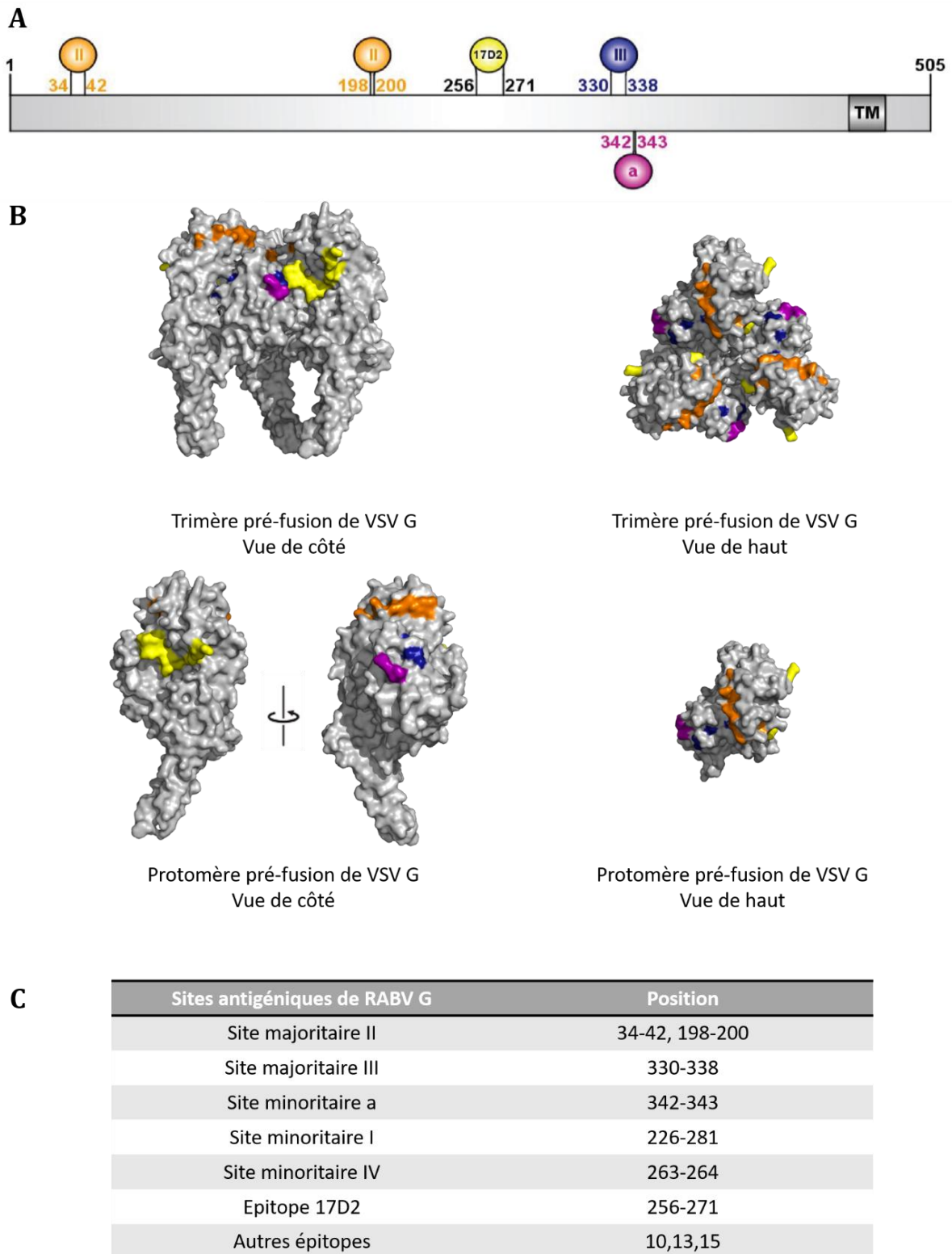


Figure 28. Sites antigéniques de RABV G.

Les sites antigéniques de RABV G représentés sur la structure primaire de la G (A) ont été replacés sur la structure pré-fusion de VSV G (B). Le tableau (C) regroupe les sites antigéniques majeurs et mineurs et les épitopes, en indiquant leur position dans la séquence primaire de la protéine.

3.2.3. Les sites antigéniques de VSV G

La principale souche de VSV pour laquelle l'antigénicité de G a été décrite est celle de VSV Indiana Mudd Summer, qui comprend trois sites antigéniques majeurs A1, A2 et B (Figure 29).

Le site antigénique A1 est défini par les résidus 241-255, celui A2 par les résidus 37-39. (Lefrancois and Lyles, 1982a, 1983; Vandepol et al., 1986). Les principaux épitopes neutralisants des sites antigéniques A1 et A2 de VSV correspondent à des sites de glycosylation chez RABV. D'ailleurs des mutants d'échappement de VSV possèdent une mutation permettant l'introduction d'un site de glycosylation ce qui abolit la reconnaissance de l'anticorps. Ceci suggère une importance de la modulation des glycosylations dans l'échappement aux anticorps dans l'évolution des Rhabdovirus.

Le site antigénique B est défini par les résidus 341-351. Il correspond à un site antigénique majeur que l'on retrouve pour la souche New Jersey de VSV, et également au site III de RABV (Luo et al., 1998; Prehaud et al., 1988; Seif et al., 1985; Vandepol et al., 1986).

Des épitopes ont également été répertoriés aux résidus 453 et 455 de VSV Indiana et New Jersey, qui se trouvent près du domaine transmembranaire, mais qui ne sont pas neutralisants. Ceci est probablement dû au fait que ces épitopes sont peu accessibles à la surface du virus.

Les sites antigéniques majeurs sont localisés à la surface de la structure de VSV G sous sa forme pré-fusion, dans le domaine d'homologie à la pleckstrine et dans le domaine de trimérisation (Figure 29) (Luo et al., 1988; Munis et al., 2018; Vandepol et al., 1986). Lorsque sont comparées les structures de glycoprotéine de VSV et de Chandipura, on remarque que le domaine d'homologie à la pleckstrine est le domaine le plus divergent ; la grande différence structurale se situant dans les régions exposées, ceci est en accord avec l'idée que l'acteur principal de l'évolution des glycoprotéines est la réponse immunitaire médiée par les anticorps circulants (Figure 30) (Baquero et al., 2015a).

3.2.5. Les anticorps et les traitements alternatifs de la rage

Tous les Lyssavirus sont capables de causer la rage (Johnson et al., 2010). Les traitements actuels sont faits avec des préparations de virus inactivés (vaccination post-exposition) ou des anticorps dirigés contre le virus RABV. Cependant, l'efficacité est variable en fonction du Lyssavirus à l'origine de la maladie et va dépendre de la distance antigénique entre les différents Lyssavirus (Badrane and Tordo, 2001; Brookes et al., 2005; Hanlon et al., 2005; Lodmell et al., 1995). Par exemple, le vaccin actuel protège uniquement contre les virus du phylogroupe I (Evans et al., 2018).

Les immunoglobulines injectées sont des immunoglobulines polyclonales humaines ou équine (OMS, 1997, (Yousaf et al., 2012) provenant de sérums qui sont rassemblés pour la préparation du traitement, ce qui n'est pas sans danger car il y a risque de choc anaphylactique, de déclencher la maladie du sérum, ou encore que le sérum soit contaminé par des agents pathogènes inconnus (Champion et al., 2000). De plus, ces traitements sont également disponibles en quantité limitée car ils proviennent de sujets hyper-immunisés (Müller et al., 2009). C'est pourquoi il existe des recherches actives pour trouver des alternatives rendant le traitement plus sûr, plus efficace, et plus accessible pour ne plus être restreint par la quantité.

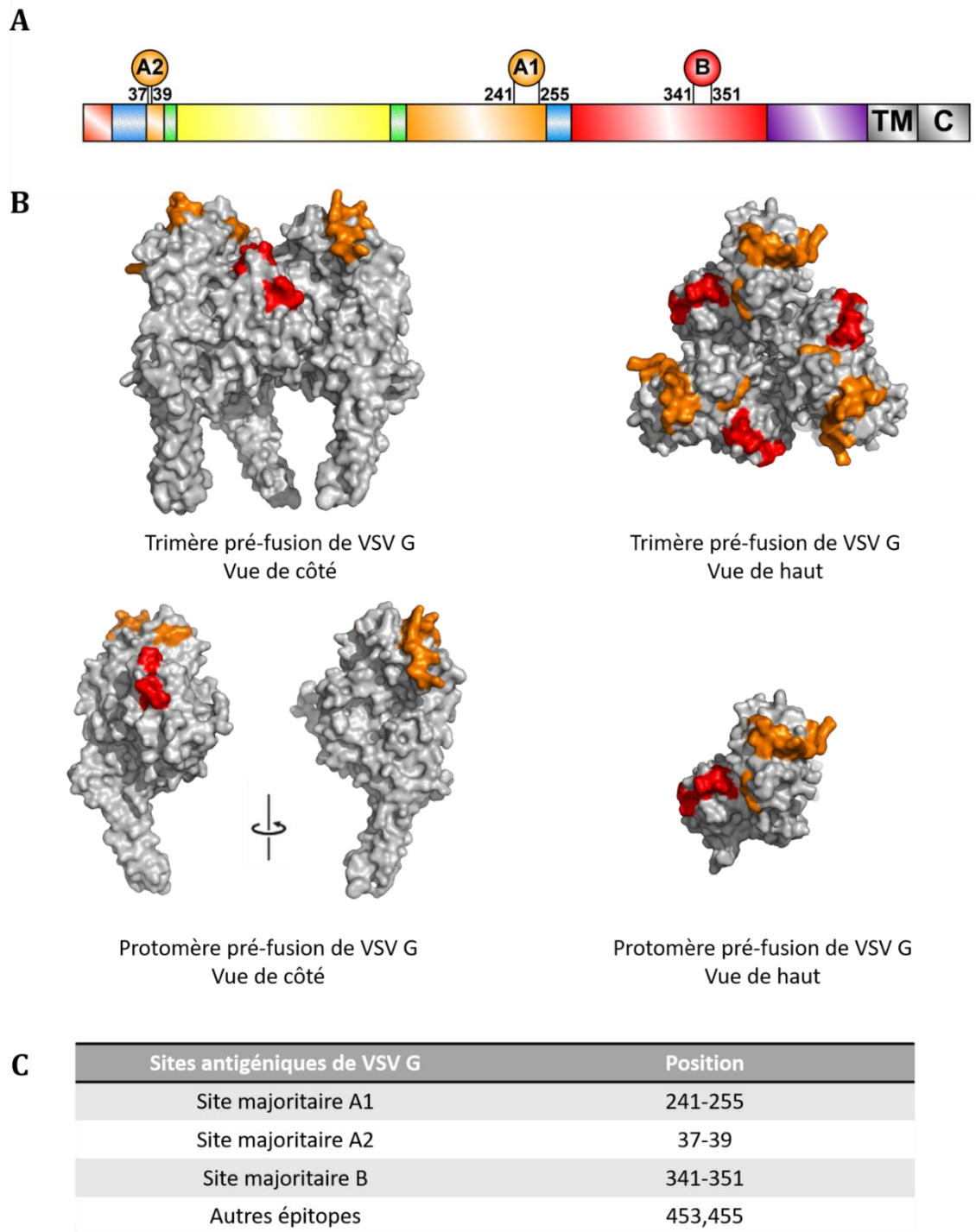


Figure 29. Sites antigéniques de VSV G.

Les sites antigéniques de VSV G représentés sur la structure primaire de la G (A) ont été replacés sur la structure pré-fusion de VSV G (B). Le tableau (C) regroupe les sites antigéniques majeurs et mineurs et les épitopes, en indiquant leur position dans la séquence primaire de la protéine.

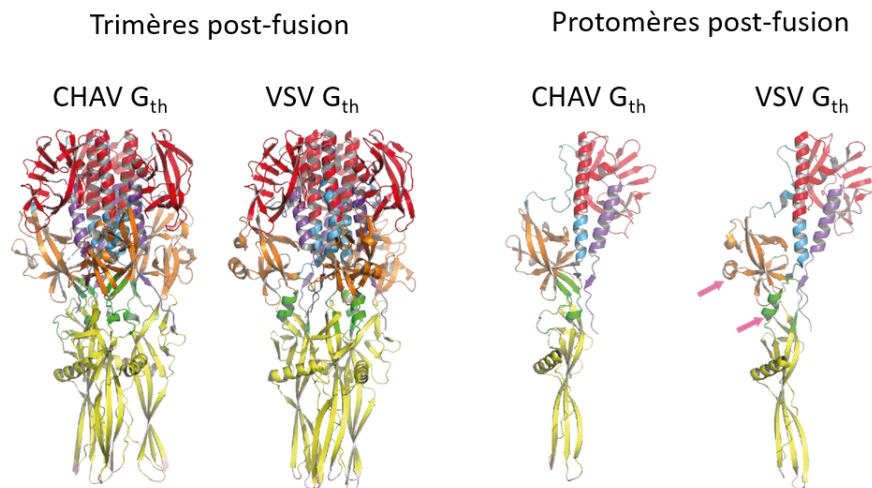


Figure 30. Différences structurales entre les G de VSV et CHAV sous conformation post-fusion.
 D'après Baquero et al, 2015. Structures des trimères et des protomères de CHAV et VSV G_{th} sous conformation post-fusion. Les flèches roses pointent les différences structurales majeures sur une structure par ailleurs bien conservée.

Des solutions sont déjà proposées comme par exemple l'utilisation d'anticorps monoclonaux de souris (Müller et al., 2009) ou d'anticorps exprimés dans des plantes (Tsekoa et al., 2016). Elles permettraient d'obtenir rapidement des quantités suffisantes d'un produit efficace et peu coûteux. L'OMS propose de se baser sur un cocktail d'anticorps monoclonaux ciblant différents épitopes, qui n'entrent pas en compétition et qui prennent en compte les variations naturelles des isolats (Marissen et al., 2005) et les autres Lyssavirus. Il faudrait donc que les épitopes reconnus par ces anticorps soient conservés et accessibles au solvant pour être optimaux.

Des épitopes ont été proposés (Mansfield et al., 2004) mais ils possèdent parfois des insertions, ou bien ils sont trop près du domaine transmembranaire et seraient donc peu accessibles à l'anticorps à la surface des particules virales. Notons quand même que pour le virus de la grippe, il existe des anticorps monoclonaux neutralisants dont l'épitope est très proche du domaine transmembranaire de HA (Benton et al., 2018).

Un cocktail de deux anticorps monoclonaux humains, l'un dirigé contre le site I, l'autre dirigé contre le site II, a aussi été proposé (Bakker et al., 2005), car le mélange de ces deux anticorps augmente la neutralisation virale par rapport à celle observée par les anticorps utilisés individuellement (Tsekoa et al., 2016).

Cependant d'autres anticorps monoclonaux dirigés l'un contre le site I et l'autre contre le site III, qui ne semblent pas être en compétition, car les sites correspondants sont éloignés sur la structure de VSV G, le sont néanmoins dans des tests de neutralisation (Bakker et al., 2005). Ceci témoigne d'un désaccord possible entre la cartographie des sites antigéniques déduite de la structure de VSV G ou bien d'une gêne stérique due à la taille des anticorps qui rend leur neutralisation croisée impossible.

Obtenir des informations structurales de RABV G ainsi que d'anticorps en complexe avec la glycoprotéine permettrait de faire avancer les études sur l'antigénicité de G et de mieux comprendre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* concernant l'interaction d'anticorps monoclonaux avec la G ou la neutralisation de l'infection virale par ces mêmes anticorps.

4. Les objectifs de la thèse

Les objectifs de ma thèse s'articulent autour de 3 axes. Le point commun de chacun de ces axes est qu'ils visent à mieux caractériser la G des Rhabdovirus.

4.1. Les bases moléculaires de l'interaction entre VSV G et son récepteur

La première partie de mon travail de thèse porte sur la première étape du cycle viral c'est-à-dire la reconnaissance du récepteur par VSV.

En 2013, il a été démontré que le récepteur de lipoprotéines de basse densité (LDLR) et d'autres membres de cette famille servaient de récepteurs au VSV (Finkelshtein et al., 2013). Le premier objectif de ce projet a été de comprendre les bases moléculaires de l'interaction entre G et son récepteur. Nous avons donc exprimé les sept domaines CR du LDLR afin de caractériser leur interaction avec G. Nous avons cristallisé et déterminé la structure de plusieurs complexes de G avec ces domaines CR.

4.2. L'antigénicité de VSV G

Une librairie d'environ 500 anticorps monoclonaux disponibles au laboratoire a permis de cartographier avec précision les sites antigéniques de la glycoprotéine du virus de la rage. Ces sites peuvent être replacés sur la structure de VSV G. Comme c'est le cas pour les sites antigéniques de VSV, les sites antigéniques de RABV G sont exposés plutôt au sommet de la structure pré-fusion quand G est à la surface du virus. En effet, 70% des anticorps monoclonaux de la librairie sont dirigés contre le site antigénique II situé dans le domaine d'homologie à la pleckstrine (qui est le plus exposé lorsque G est dans sa conformation pré-fusion).

Néanmoins, à l'heure actuelle chez les Rhabdovirus il n'existe aucune structure de G en complexe avec un anticorps. Le deuxième objectif de ce projet était donc d'obtenir la structure d'un complexe entre VSV G et un Fab dérivé d'un anticorps monoclonal commercial.

4.3. Structure de la G de Lyssavirus

A l'heure actuelle aucune structure de glycoprotéine de Lyssavirus n'a été résolue. Le troisième objectif de ma thèse visait à obtenir la structure de G de RABV mais également d'autres Lyssavirus comme le virus Duvenhage, et de ceux appartenant à d'autres phylogroupes comme le virus Mokola (phylogroupe II) et le virus de la chauve-souris ouest africaine (phylogroupe III).



MATERIEL ET METHODES

1. Biologie moléculaire

1.1. Souches bactériennes

Pour effectuer les clonages et l'amplification de plasmides, la souche E. Coli DH5 α a été utilisée. Pour produire les protéines la souche E. Coli C41 a été utilisée.

1.2. Milieux de cultures bactériens

Le milieu de culture utilisé est le Luria Broth (LB) composé de bactotryptone 1 % pH 7,5, extrait de levure 0,5 %, NaCl 1 %.

1.3. Clonage

Les PCR sont réalisées dans un volume final de 50 μ L. Le mélange réactionnel contient 20 ng de matrice, les amorces (0,6 μ M chaque), les dNTPs (200 μ M), 4 unités de Phusion Hot Start II HF (ThermoFisherScientific).

Le programme PCR utilisé est le suivant :

<i>Etape</i>	<i>Température</i>	<i>Durée</i>
Dénaturation initiale	98°C	30 secondes
25 cycles	98°C (dénaturation)	20 secondes
	58-69°C (hybridation)	1 minute
	72°C (élongation)	40 secondes/kb
Elongation finale	72°C	2-5 minutes

Les amorces suivantes sont utilisées pour linéariser le vecteur et l'amplification des fragments à cloner. Ces amorces permettent l'amplification des fragments avec des séquences chevauchantes (en minuscules dans le tableau) afin de permettre le clonage par la méthode de Gibson :

<i>Nom</i>	<i>Séquences (5'-3')</i>
<i>pT350_lin_A</i>	cccgagcgagaggccaac
<i>pT350_lin_B</i>	gacgatgacgataaggcc
<i>PVG_1-418_A</i>	cgctcgggAAATTCCCTATTTACACGAT
<i>PVG_1-418_B</i>	tcatcgtcAACTTCAACAAAATCCTCAG
<i>PVG_1-422_A</i>	cgctcgggAAATTCCCTATTTACACGAT
<i>PVG_1-422_B</i>	tcatcgtcATCGGGAAGGTGAACTTCAACAAAATCCT
<i>PVG_1-425_A</i>	ttgttgctctcgtcgggAAATTCCCTATTTACACGATACCAGACAAG
<i>PVG_1-425_B</i>	ccctggaacagaactccagTTCGTGCACATCGGGAAGGTG
<i>PVG_1-430_A</i>	cgctcgggAAATTCCCTATTTACACGAT
<i>PVG_1-430_B</i>	tcatcgtcAACTCCTGAGATCCGTTTCGTGCACATCGGGAAGGTGAACTTCAACAAAATC
<i>PVG_1-440_A</i>	ttgttgctctcgtcgggAAATTCCCTATTTACACGATACCAGACAAG
<i>PVG_1-440_B</i>	gggcccctggaacagaactccagATACTTCCCCAGTTCGGGAG
<i>DUVG_1-440_A</i>	ttgttgctctcgtcgggAAGTTTCCCATTATACGATC
<i>DUVG_1-440_B</i>	ccggccttatcgtcatcgtcGTAACGTTTCCACTCTGG
<i>WCBG_1-441_A</i>	cctttgttgctctcgtcgggGGTCTTTTCCCCCTTTAC
<i>WCBG_1-441_B</i>	ccggccttatcgtcatcgtcATATCTTCCAGTCTGATAAC
<i>MOKG_1-436_A</i>	ttgttgctctcgtcgggGAATTCCCCTTGACACAATTCC
<i>MOKG_1-436_B</i>	ccggccttatcgtcatcgtcATGAGGCAGACCCAGGTC

Les produits PCR sont ensuite digérés avec l'enzyme de restriction Dpn1 de façon à éliminer la matrice méthylée. Les produits de PCR digérés sont ensuite purifiés à l'aide du kit de purification NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel).

Les différentes constructions sont clonées dans un vecteur pT350. En amont du gène d'intérêt se trouve une séquence signal BiP Drosophila permettant la sécrétion de la protéine ainsi qu'un promoteur MT Drosophila Metallothionein inductible au cuivre. En aval du gène une double étiquette strep ainsi qu'un site de clivage à l'enterokinase ou à la PreScission sont présents.

Assemblage des différents fragments et transformation

Les inserts et le vecteur linéarisé sont assemblés par réaction de Gibson. Pour cela, 50 ng de vecteurs et 200 ng d'inserts sont incubés avec 5 µL de Nebuilder mix 2X pendant 1h à 50°C. 25 µL de DH5α (haute efficacité, NEB) sont transformées avec 2 µL de réaction puis sont étalées sur milieu LB agar ampicilline et incubées à 37°C sur la nuit.

Vérification des constructions par PCR sur colonie

Pour chaque construction, les clones positifs (contenant l'insert) sont identifiés par PCR sur colonies.

Le programme PCR utilisé est le suivant :

<i>Etape</i>	<i>Température</i>	<i>Durée</i>
Dénaturation initiale	98°C	30 secondes
25 cycles	98°C (dénaturation)	30 secondes
	68°C (hybridation)	1 minute et 40 secondes
	72°C (élongation)	1 minute
Elongation finale	72°C	5 minutes

Pour les PCR donnant un résultat positif, l'ADN plasmidique est purifié en utilisant un kit d'extractions d'ADN (Macherey-Nagel). Cet ADN purifié est ensuite séquencé pour vérifier qu'il n'y a pas de mutations dans la construction.

2. Biologie cellulaire

2.1. Souches cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées. Les cellules BSR (clones de cellules BHK-21 - Baby Hamster Kidney-) sont cultivées à 37°C sous atmosphère contenant 5 % de CO₂, dans du DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et supplémenté avec 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine.

L'hybridome 8G5F11 sécrète des anticorps dirigés contre VSV G dans le surnageant de culture. Il est cultivé dans un bioréacteur (CL1000 de Wheaton) permettant d'atteindre une haute densité cellulaire dans un petit volume de culture.

Le bioréacteur est composé de deux compartiments, l'un de 20 mL contenant les cellules dans du milieu contenant du sérum déplété en immunoglobulines et l'autre de 1 L contenant le milieu de culture sans sérum. Les deux compartiments sont séparés par une membrane perméable qui permet la diffusion des nutriments du milieu mais ne permet pas le passage des anticorps sécrétés qui restent piégés dans le compartiment des cellules.

Le milieu de culture pour les l'hybridome est le RPMI (Lonza) supplémenté avec 1 mM de Pyruvate sodium, 3 mM de Glutamine, 20 mM de glucose, et 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine contenant ou non 10 % de sérum déplété en immunoglobuline.

La lignée cellulaire Drosophila Schneider 2 (S2) (Invitrogen) est issue d'une culture primaire d'embryons de Drosophila melanogaster S2 au dernier stade de développement. Les cellules S2 sont cultivées à 28°C. Elles ont été adaptées au milieu synthétique Express Five SFM (Gibco) supplémenté par 20 mM de Glutamine et 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine.

2.2. Virus et souches

La souche virale de rage utilisée est la souche Pasteur Virus (PV). La souche de VSV utilisée est Mudd-Summer, sérotype Indiana. Le virus recombinant VSV-eGFP qui possède le génome de VSV avec un gène supplémentaire codant l'eGFP, a été conçu par Jacques Perrault.

2.3. Infection des cellules

Les cellules sont infectées avec du virus dilué dans un tampon de dilution (TD : 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄) contenant 5 % de tryptose, à la multiplicité d'infection (MOI) souhaitée. L'ensemble est déposé sur les cellules à 80 % de confluence. Après une heure d'adsorption à température ambiante, l'inoculum est retiré, puis du milieu DMEM contenant 2 % de SVF est ajouté. Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère contenant 5 % de CO₂, pendant le temps d'infection désiré.

2.4. Production et purification de virus

Production de virus concentré pour la purification de G

Les souches de VSV sont amplifiées en infectant des BSR avec une MOI égale à 0,1. 20h post-infection, le surnageant est récolté et filtré pour éliminer les débris cellulaires. Le virus est concentré par une première étape de centrifugation de 3h à 12 000 rotation/minute (rpm) à 4°C dans un rotor JLA 16.250 (Beckman). Le virus est ensuite remis en suspension dans un tampon TD (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 25 mM Tris-HCl pH 7,5) puis déposé sur un coussin de glycérol (25 % v/v glycérol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) et centrifugé pendant 50 minutes à 25 000 rpm, 4°C dans un rotor SW32 (Beckman).

Le culot contenant le virus purifié est repris dans 1 mL de TD puis stocké à -80°C pour une utilisation ultérieure.

La souche PV de RABV est produite de la même façon, à l'exception que le surnageant est récolté 3 jours post infection.

Purification de virus pour la microscopie électronique

VSV (Mudd summer) est amplifié en infectant des BSR avec une MOI égale à 0,1. 16h post-infection, le surnageant est récolté puis filtré pour éliminer les débris cellulaires. Le virus est concentré par une étape d'ultracentrifugation de 50 minutes à 12 000 rpm à 4°C dans un rotor SW32 (Beckman). Le culot contenant les particules virales, est rincé avec un tampon TN contenant 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl et des inhibiteurs de protéases. Le culot contenant le virus purifié est resuspendu dans 200 µL de tampon TN sur la nuit à 4°C.

Pour l'observation à pH 6, le virus est dialysé pendant 3 heures contre un tampon contenant 40 mM MES pH6, 150 mM NaCl.

2.5. Neutralisation de l'infection virale par les Fab

Une plaque 24 puits estensemencée avec 250 000 cellules BSR par puits la veille de l'expérience. 100 μL de virus VSVeGFP dilués sont ajoutés à 10 μL de Fab de concentration décroissante. En absence de Fab la MOI de l'inoculum est de 1. Ces inocula sont incubés 45 minutes à température ambiante (environ 25°C) avant d'être utilisés pour infecter les cellules. 4h post infection, les cellules sont décollées et lavées avec du PBS avant d'être passées au cytometre pour mesurer le pourcentage de cellules infectées.

2.6. Interaction entre VSV G et les Fab

Pour les tests d'interaction avec les protéines purifiées : 5 μM de VSV G_{th}, 5 μM de BSA et 5 μM d'anticorps 8G5F11 sont incubées dans un tampon contenant 20 mM sodium phosphate pH 5,5, pH 6, pH 7, ou pH 8, et 200 mM NaCl durant 30 minutes, à 20°C, sous agitation avant ajout de 15 μL de résine sépharose couplée à la protéine A.

Après 30 minutes d'incubation, la résine est lavée et puis analysée directement par SDS-PAGE.

Pour les tests d'interactions avec les particules virales : 270 μg de VSV purifié et 105 μg de Fab sont séparément pre-incubées à pH 7 ou à pH 5,5 durant 30 minutes à 20°C, avant d'être rassemblées pendant 30 minutes, 20°C. Chaque mélange VSV-Fab est déposé sur un coussin de 22,5 % glycérol 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA ou 10 mM Tris-HCl, 50 mM MES pH5,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA avant centrifugation à 40 000 rpm, 1h, 20°C (rotor SW55, Beckman)

A la fin de la centrifugation, le surnageant et culots sont récupérés puis analysés par SDS PAGE.

3. Biochimie

3.1. Production et purification des protéines

Purification de VSV G_{th}

8 ml de VSV purifié et concentré est incubé à 37°C, pendant 30 min avec 2 mL de tampon phosphate citrate (PC) à pH 6 (130mM Na₂HPO₃ / 30mM d'acide citrique). Ensuite 12 μL de thermolysine à 100mg/ml sont ajoutés aux particules virales à 37°C pendant 30 minutes. La réaction de protéolyse est ensuite stoppée par l'ajout de 1,2 mL de tampon contenant des inhibiteurs de protéase (Roche), 50 mM EDTA, 900 mM Tris-HCl pH 8,8. Après centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 40 minutes, la fraction soluble contenant G_{th} est récupérée.

Une étape de purification sur coussin de sucrose (20 % p/v sucrose 50 mM Tris-HCl pH 8,8) par centrifugation durant 50 min à 36 000 rpm (rotor SW41 Beckman) permet de débarrasser l'échantillon des objets de grosse taille.

Le surnageant est dilué 5 fois dans un tampon 10 mM Tris-HCl pH 8 puis chargé sur une colonne gravimétrique contenant 1 ml de résine DEAE-Trysacryl (SIGMA). Après lavage de la résine, G_{th} est éluée avec un tampon contenant 10 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl.

Les fractions contenant G_{th} sont concentrées puis injectées sur une colonne Superdex 200 Increase 30/100 (GE Healthcare) équilibrée dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH 8.

Les fractions contenant G_{th} sont concentrées (Amicon Ultra 30 kDa c/o -Millipore-) jusqu'à une concentration de 10 mg/mL. La protéine est gardée à -80°C pour une utilisation ultérieure.

Production et purification des domaines CR

Une préculture de 300 mL de C41 transformées avec le vecteur pGex6P1-CRx est utilisée pour inoculer 3 L de LB supplémenté avec 100 µg/ml d'ampicilline. Les bactéries sont ensuite cultivées à 37°C. Lorsque la densité de la culture atteint une DO_{600nm} comprise entre 0,6 et 0,8 UA la production de la protéine est induite par ajout de 1 mM IPTG final durant 5h à 37°C. Les culots de bactéries correspondant à 3L de culture (environ 6g) sont repris dans 70 mL de tampon de resuspension : 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM $CaCl_2$, 0.05 mM PMSF auquel on rajoute un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Roche) et du lysozyme. Après 20 minutes d'incubation sur glace, 2% w/v de sarkozyl et 10 mM de DTT sont ajoutés. Le culot est soniqué 4 fois 30 secondes à 80 % d'amplitude, par des impulsions de 5 secondes puis le lysat bactérien est centrifugé à 20000 g, pendant 40 minutes à 4°C (rotor JA 25 5 Beckman). Le surnageant, contenant les protéines solubilisées, est récupéré. 3% v/v de Triton X100 est ajouté au surnageant avant d'être incubée à température ambiante sous agitation avec 2 mL de résine Glutathionne agarose (Thermofisher Scientific). Après 2 heures d'incubation la résine est lavée extensivement par centrifugation à basse vitesse (6 min, 1500 g) avec le tampon de lavage (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM $CaCl_2$, 0.05 mM PMSF). La résine est ensuite chargée sur une colonne gravimétrique et les protéines retenues sur la résine sont éluées dans le tampon d'éluion suivant : 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM $CaCl_2$, GSH à 20 mM.

Le plasmide pGex6P1 contient un site de reconnaissance pour la PreScission protéase situé entre l'étiquette GST et la séquence clonée. 10 mg de GST-CRx sont incubés avec 1mg de PreScission Protéase à 4°C, sur la nuit. Les CR sont purifiés par une étape de chromatographie d'exclusion de taille sur Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) dans un tampon 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM $CaCl_2$, 0.05 mM PMSF. Les fractions contenant les CR sont concentrées (Amicon Ultra 3kDa c/o, Millipore) jusqu'à la concentration désirée.

Production et purification des Fab

Le surnageant de culture d'hybridomes est filtré puis incubé avec de la résine d'agarose couplé à la protéine A (SIGMA) à 4°C pendant 2h. Après chargement sur colonne gravimétrique la résine est lavée avec un tampon 20 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl à pH 8. Les anticorps sont élués dans un tampon 20 mM NaH_2PO_4 100 mM acide citrique à pH 3. Le pH des fractions d'éluion est directement neutralisé par ajout de Tris-HCl 1 M à pH 12. Les fractions contenant les anticorps sont concentrées (Amicon Ultra 100 kDa c/o -Millipore) jusqu'à un volume de 0,5 mL. Les anticorps sont digérés par de la papaïne immobilisée sur billes selon les instructions du fournisseur (Thermofisher). Les Fab résultants sont concentrés (Amicon Ultra 10 kDa c/o -Millipore-) jusqu'à un volume de 1mL puis sont injectés sur une colonne Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) équilibrée avec un tampon 10 mM Tris HCl pH 8. Les fractions contenant les Fab sont concentrées (Amicon Ultra 10 kDa c/o -Millipore-) jusqu'à la concentration désirée. Les Fab sont conservés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

Purification du complexe VSV G_{th}-Fab

Les Fab et G_{th} purifiés sont incubés à un ratio molaire de 1,3 : 1 pendant 15 min, à 20°C. avant injections sur Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) équilibrée avec un tampon 20 mM Tris-HCl pH8. Les fractions contenant le complexe G_{th} Fab sont concentrées (Amicon Ultra 50 kDa c/o -Millipore-). La concentration du complexe G_{th} Fab est évaluée par dosage Bradford.

Purification de la forme complète de GPV

1mL de particules virales à 10 mg/ml de virus de la rage (souche PV) est incubé 1h à 37°C avec 1,4% CHAPS final. G_n solubilisée est séparée du reste des particules virales par ultracentrifugation à 30 000 rpm (rotor SW41, Beckman), 50 minutes, 20°C sur un coussin de sucrose constitué de 25 % sucrose, 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 % CHAPS, 2mM EDTA, 1 mM PMSF. Le surnageant contenant G_n solubilisée est chargé sur une colonne échangeuse d'anion (ResourceQ 15Q (GE Healthcare)). Une étape de lavage avec un tampon 20 mM Tris-HCl pH 8, 0,05 % p/v DDM, 2mM EDTA, 1mM PMSF permet de remplacer le CHAPS par le DDM. G_n est éluée par un gradient de NaCl, aux alentours de 100mM. G_n est ensuite injectées sur colonne Superdex 200 increase 10/300 (GE Healthcare) équilibrées dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH 8, 0,05 % DDM, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF. G_n est concentrées (Amicon Ultra 100 kDa c/o –Millipore-) jusqu'à la concentration désirée.

Purification des ectodomaines de glycoprotéines de Lyssavirus produits en S2

Comme expliqué dans Backovic and Krey, 2016, des lignées cellulaires stables exprimant les protéines recombinantes ont été générées en co-transfectant des cellules S2 avec un plasmide codant pour la protéine d'intérêt dans un vecteur pT350 et un plasmide codant pour le gène de résistance à la puromycine (Backovic and Krey, 2016)

L'établissement des lignées stables se fait sur 3 semaines de la manière suivante :

Jour	Etape	Mode opératoire
1	Ensemencement des cellules	1,5 x 10 ⁷ cellules S2 sont ensemencées dans des flasque de 75cm ² dans 15 ml de milieu Express Five (Gibco) supplémenté avec 20 mM Glutamine et pénicilline/ streptomycine. Elles sont incubées à 28°C pendant 24h.
2	Transfection des cellules	2µg pT350 codant pour la protéine d'intérêt et 0,1 µg de pCoBlast sont utilisés avec l'agent de transfection Effectene (Qiagen), selon les indications du fournisseur. Les cellules sont incubées à 28°C pendant 24h.
3	Sélection des cellules transformées	La puromycine est ajoutée à une concentration finale de 7 µg/ml.
8	Changement du milieu	Le surnageant des cellules est récupéré et centrifugé à 200g pendant 5 min puis repris dans 10 ml de milieu contenant de la puromycine (7 µg/ml)(milieuP).
13	Amplification	Les cellules sont transférées dans une flasque de 175 cm ² .
18	Lignée stable établie	La lignée cellulaire stable est maintenant établie. L'expression de la protéine peut être détectée par SDS-PAGE et Western Blot après induction par ajout de CuSO ₄ à une concentration finale de 500µM.

Pour produire les ectodomaines de G des Lyssavirus en quantité importante, les cellules S2 contenues dans 4 flasques de 175cm² sont transférées dans un erlenmeyer contenant 400 mL final de milieuP. Les cellules sont incubées à 28°C sous agitation de 120 rpm ; lorsque la densité cellulaire atteint 1,5.10⁷cellules/mL, 400 mL de milieuP sont ajoutés et la production protéique est induite par 500 µM de CuSO₄. Le surnageant de culture est récolté 5 jours après induction puis concentré par filtration tangentielle (Vivaflow 200, VWR). Les ectodomaines des G de Lyssavirus étiquetés en C-terminal par une double étiquette STREP sont ensuite purifiés sur colonne d'affinité de streptavidine (streptap, GE Healthcare) dans un tampon 20

mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA. L'éluion se fait dans ce même tampon auquel est ajouté 3 mM d' α -Desthiobiotine. La dernière étape de purification est une chromatographie d'exclusion de taille sur colonne Superdex 200 increase 10/300 (GE Healthcare) équilibrée dans 20mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA. Les fractions contenant l'ectodomaine purifié sont ensuite concentrées (Amicon Ultra 30kDa c/o - Millipore-) jusqu'à la concentration désirée.

3.2. SEC MALS

100 μ L de GPV440m (1.5 mg/mL) sont injectés sur une Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) équilibrée dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA à un débit de 0,5 mL/min (système Shimadzu HPLC). La détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur à diffusion statique de lumière multi-angle MiniDAWN TREOS, d'un réfractomètre différentiel Optilab T-rEX (technologie Wyatt) et d'un détecteur UV visible (Shimadzu).

Les poids moléculaires de GPV440m et de ses glycosylations ont été déterminés avec le logiciel Astra 6.1 à l'aide de la méthode « protein-conjugate ». Cette méthode repose sur l'utilisation des trois signaux (diffusion de la lumière, absorbance et réfractométrie) afin de déterminer le poids moléculaire de la protéine et du conjugué (dans notre cas, les glycosylations) en complexe. Le formalisme de la méthode du protein-conjugate a été décrit dans Veessler et al. (Veessler et al., 2009) avec un complexe protéine-détergent. Par analogie, le système peut être appliqué à un complexe protéine-glycosylation en utilisant une valeur d'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) de 0,183 mL/g pour la partie protéique et 0.15 mL/g pour les glycosylations et un coefficient d'extinction molaire de 1.228 mL/mg.cm⁻¹ pour la partie protéique et nul pour les glycosylations.

4. Biologie structurale

4.1. Cristallogénèse

Pour tester de nombreuses conditions de cristallisation, nous avons utilisé le robot de cristallisation Mosquito LCP (LabTech TTP) de la plateforme de cristallisation de l'I2BC qui permet de cribler un nombre important de conditions en utilisant peu de matériel (0.1 μ L de protéine + 0.1 μ L de condition de cristallisation). Un système d'imagerie Formulatrix RockImager (Formulatrix, Inc., U.S.) permet ensuite l'acquisition automatique de photographies des gouttes à 20°. Après identification de conditions permettant l'obtention de cristaux, les nanogouttes sont reproduites par la méthode de goutte suspendue en mélangeant un 1 μ L de protéine concentrée au même volume de solution précipitante. Les cristaux sont congelés dans une solution cryo-protectante et sont ensuite testés au synchrotron (SOLEIL sur les lignes Proxima 1 et 2 ou ESRF).

4.2. Microscopie et cryo-EM

4.2.1. Microscopie électronique en coloration négative de VSV ou de différentes G

Pour la visualisation des échantillons par microscopie électronique en coloration négative, des grilles de cuivre de 400 Mesh recouvertes d'un film de carbone sont rendues hydrophiles par un système d'effluage (Glow discharge). Les protéines ou virus sont déposés sur la grille qui est ensuite séchée et trempée dans un colorant permettant la coloration négative. Le principe de cette technique est d'enrober l'échantillon avec un sel d'atomes lourds (acétate d'uranyle, le phosphotungstate de sodium -NaPT-) qui sont beaucoup plus diffusants que les

atomes légers constituant les protéines. Cela donne un contraste plus élevé permettant ainsi la visualisation de l'objet qui apparaît alors en négatif.

Les échantillons colorés sont ensuite observés en utilisant un Microscope Tecnai Spirit 120kV (FEI) doté d'une caméra GATAN K2 base, disponible sur la plateforme de Cryo-microscopie électronique de l'I2BC. Les échantillons sont observés à un grossissement compris entre 15 000X et 21 000X pour les particules virales et de 26 000X pour les protéines.

Microscopie électronique du complexe VSV G_{th}-Fab

Le complexe G_{th}-Fab est formé directement sur les grilles de microscopie. Pour cela, 3 µL de G_{th} à 20 µg/ml ou le VSV incubé au pH désiré sont adsorbés pendant 2 minutes sur la grille. La grille est ensuite rincée dans le tampon au pH voulu (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA ou 20 mM MES pH 6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA). Ensuite 3 µL de Fab à 30 µg/ml sont ajoutés directement sur la grille pendant 5 minutes. Les lavages sont effectués dans les mêmes tampons. Les grilles sont ensuite colorées avec du NaPT à pH 7,5 ou à pH 6 (pour l'observation du virus) ou avec de l'acétate d'uranyle pH 5,5 pour l'observation de G_{th} Fab à bas pH.

Microscopie électronique des ectodomaines de G produits en S2

3 µL d'ectodomaine purifié incubés au pH désiré sont adsorbés sur une grille de carbone. A pH 8, le tampon dans lequel se trouvent les ectodomaines est constitué de 20 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA. Le changement de pH de l'échantillon à observer se fait par ajout de MES à pH 5,5 à une concentration finale de 100 mM suivi d'une incubation à 37°C pendant 3h.

Microscopie électronique de GPV complète en présence de détergent

3 µL de GPV_{fl} pré-incubé dans un tampon contenant 0.05 % DDM, 100 mM MES pH 6, 3h à 37° sont déposés sur des grilles avant d'être coloré par une solution de 2 % d'acétate d'uranyle.

4.2.2. Cryo-EM de VSV G_{th}-Fab et GPV_{fl}

Les grilles de cryo-EM sont préparées avec le Vitrobot Mark IV (FEI). Après adsorption de l'échantillon sur la grille, la grille est séchée puis rapidement plongée dans l'éthane liquide. La grille est ensuite maintenue à la température de l'azote liquide (-185 °C) après congélation et durant l'observation. L'observation se fait sur le Microscope Tecnai G2 200 kV (FEI) doté d'un canon à effet de champ (FEG), à l'aide d'une caméra à détection directe GATAN K2 SUMMIT, disponible sur la plateforme de cryo-microscopie électronique de l'I2BC. Afin de limiter les dommages d'irradiation, de faibles doses d'électrons sont utilisées en « low-dose » et « dose-fractionning » correspondant à 80-90 électrons/Å² sur 8 secondes totales, 0,2 secondes/image. Les 40 images sont ensuite alignées.

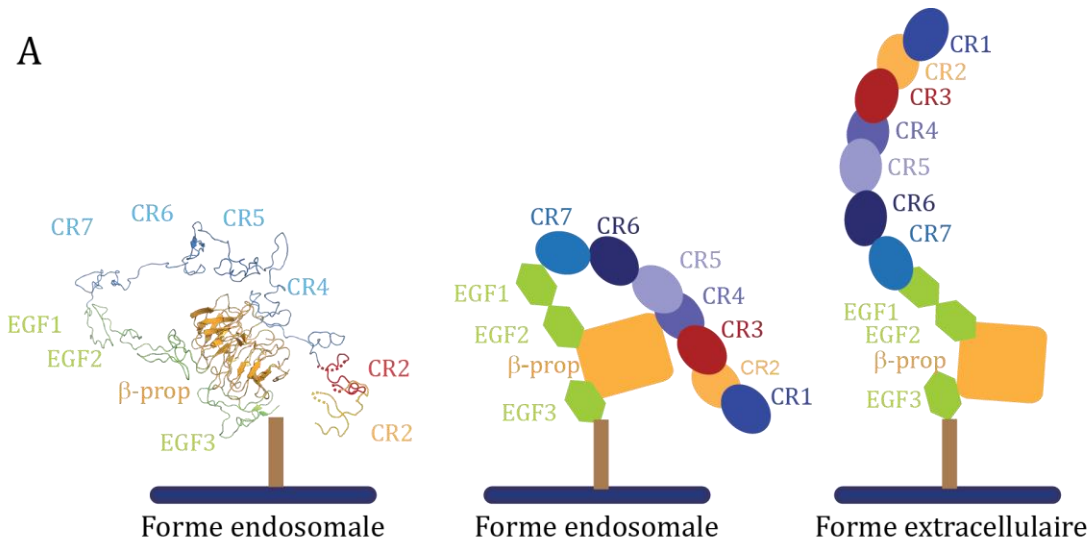
Cryo-EM du complexe VSV G_{th}-Fab

Les grilles utilisées sont des grilles à trous Quantifoil (Cu, 200 mesh, R2.2) avec un film de carbone d'une épaisseur de 20 à 50 nm. 3 µL de G_{th} (0,8 mg/ml) pré-incubé à pH 6 dans un tampon contenant 100 mM MES pH 6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, sont déposés sur la grille, après lavages, 3 µL de Fab (dilué à 0,9 mg/ml dans le même tampon) sont déposés à leur tour sur la grille. La grille est lavée puis séchée avant d'être rapidement congelée dans l'éthane liquide.

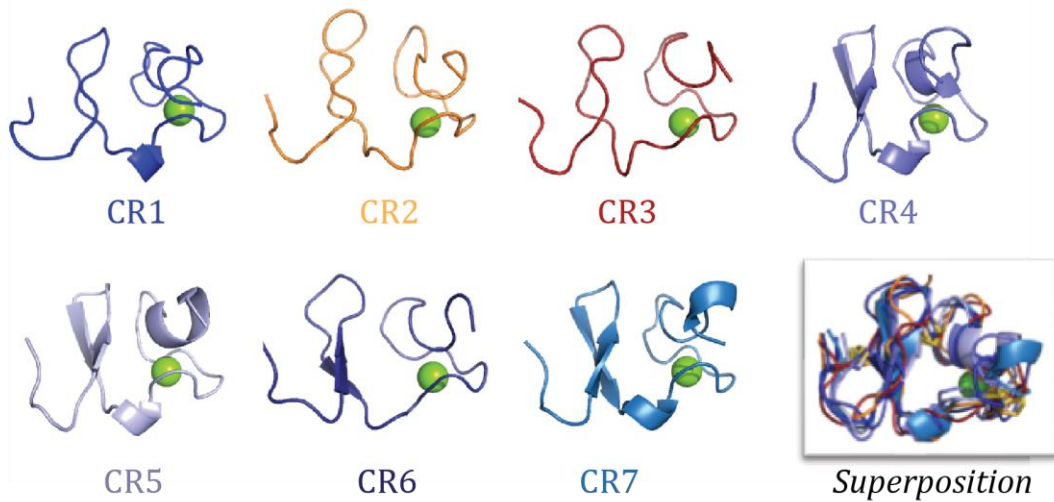
Cryo- EM de GP_{Vfl} en présence de détergent

Les grilles utilisées sont des grilles à trous C-flat (Cu 200 mesh, R2.2) avec un film de carbone d'une épaisseur de 20 nm. 3 μ L de GPV_{fl} (3 mg/ml) pré-incubé à pH 6 dans un tampon contenant 0.05 % DDM, 100 mM MES pH 6, sont déposés sur la grille. Après lavages, et séchage, la grille est rapidement congelée dans l'éthane liquide.

A



B



C

CR1 2-43	VGDR	CE	.RNE	FQ	CQD	..GK	CI	SYK	WV	CD	GSA	EC	QD	GS	DE	SQET	CL	
CR2 44-84	.SVT	CK	.SGDF	FS	CGGRVNR	CI	PQF	WR	CD	GQV	DC	DN	GS	DE	..QG	CP		
CR3 85-123	.PKT	CS	.QDEF	FR	CHD	..GK	CI	SRQ	FV	CD	SDR	DC	LS	DE	..AS	CP		
CR4 124-171	.VLT	CG	.PAS	FQ	CNS	..ST	CI	PQL	WA	CD	NDP	DC	ED	GS	DE	WPQR	CR	
CR5 172-211	DSSP	CS	.AFE	FH	CLS	..GE	CI	HSS	WR	CD	GGP	DC	DK	DS	DE	..EN	CA	
CR6 212-251	.VAT	CR	.PDEF	FQ	CSD	..GN	CI	HGS	RO	CD	REY	DC	DM	DS	DE	..VG	CV	
CR7 252-292	.VTL	CE	GP	NK	FK	CHS	..GE	CI	TLD	KV	CN	MAR	DC	RD	WS	DE	PIKE	C.

Figure 31. Les domaines CR du LDLR.

A. A gauche, la structure cristallographique du LDLR sous sa forme endosomale (Rudenko et al., 2002), à droite les schémas des formes endosomale et extracellulaire du LDLR colorés de la même façon. Les domaines EGF (Epidermal Growth Factor) sont en vert, le β -propeller orange, les domaines CR dans différents tons de bleus à l'exception de CR2 en jaune et CR3 en rouge. B. Structures de chaque domaine CR isolé. La superposition de ces structures montre que les domaines CR partagent le même repliement. C. Alignement des séquences d'acides aminés des domaines CR. Les résidus conservés sont encadrés en rouge, ceux encadrés en bleu ont des propriétés proches. Les ovales bleus indiquent les résidus acides conservés faisant partis de la cage octaédrale permettant la liaison de l'ion Ca^{2+} qui est indispensable au LDLR pour son repliement. L'ion Ca^{2+} est nécessaire pour l'entrée de VSV dans les cellules (Finkelshtein et al., 2013).

RESULTATS

1. Les bases moléculaires de l'interaction entre VSV G et son récepteur

1.1. Introduction

VSV pénètre dans les cellules en utilisant des récepteurs ubiquitaires. Ces récepteurs sont les membres de la famille des récepteurs aux lipoprotéines de basse densité (LDLR) (Finkelshtein et al., 2013). Ces récepteurs sont largement exprimés chez les vertébrés ce qui explique le pantropisme du VSV. Cela explique également pourquoi les lentivirus pseudotypés par VSV G ne permettent pas une transduction efficace de certains types cellulaires comme les lymphocytes T non stimulés, les lymphocytes B et les cellules souches hématopoïétiques ; puisque ces cellules présentent toutes un faible niveau d'expression de LDLR à leur surface (Amirache et al., 2014).

Le LDLR est une protéine transmembranaire régulant l'homéostasie du cholestérol dans les cellules de mammifère (Brown et Goldstein, 1986). Le domaine de liaison au ligand du LDLR est constitué de 7 répétitions riches en cystéine (CR1–CR7) (Figure 31). Chaque répétition est composée de 40 résidus structurés de la même façon grâce à trois ponts disulfures et un groupe de résidus acides formant une cage octaédrale chélatant un ion calcium (Figure 31, B) (Rudenko et al., 2002). Les cystéines impliquées dans la formation des ponts dissulfures et les résidus impliqués dans la coordination de l'ion calcium sont conservés pour les 7 domaines CR (Figure 31,C).

Dans leur étude, Finkelshtein et ses collaborateurs ont incubé des cellules exprimant le LDLR avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CR3 et CR6. Ils ont montré que les anticorps dirigés contre CR3 bloquaient l'infection, ce qui n'était pas le cas des anticorps dirigés contre CR6. Cela suggère que le domaine CR3 est indispensable -il doit être présent et accessible- pour que VSV puisse infecter des cellules à la différence de CR6 dont l'accessibilité ne semble pas nécessaire. L'étude suggère également que VSV doit pouvoir emprunter d'autres récepteurs alternatifs au LDLR et que ces récepteurs alternatifs sont des membres de la famille du LDLR.

Dans l'étude présentée ci-après nous sommes intéressés à l'interaction de VSV G avec les différents domaines CR du LDLR, et plus précisément au mécanisme moléculaire de cette interaction. D'autre part nous avons investigué la possibilité pour VSV d'emprunter des récepteurs alternatifs pour entrer dans les cellules.

1.2. Résultats



ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-018-03432-4

OPEN

Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein

Jovan Nikolic ¹, Laura Belot¹, Hélène Raux¹, Pierre Legrand ², Yves Gaudin ¹ & Aurélie A. Albertini¹

Vesicular stomatitis virus (VSV) is an oncolytic rhabdovirus and its glycoprotein G is widely used to pseudotype other viruses for gene therapy. Low-density lipoprotein receptor (LDL-R) serves as a major entry receptor for VSV. Here we report two crystal structures of VSV G in complex with two distinct cysteine-rich domains (CR2 and CR3) of LDL-R, showing that their binding sites on G are identical. We identify two basic residues on G, which are essential for its interaction with CR2 and CR3. Mutating these residues abolishes VSV infectivity even though VSV can use alternative receptors, indicating that all VSV receptors are members of the LDL-R family. Collectively, our data suggest that VSV G has specifically evolved to interact with receptor CR domains. These structural insights into the interaction between VSV G and host cell receptors provide a basis for the design of recombinant viruses with an altered tropism.

¹Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France. ²Synchrotron SOLEIL, 91192 Gif-sur-Yvette cedex, France. These authors contributed equally: Jovan Nikolic, Laura Belot. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.G. (email: yves.gaudin@i2bc.paris-saclay.fr) or to A. Albertini. (email: aurelie.albertini@i2bc.paris-saclay.fr)

Vesicular stomatitis virus (VSV) is an enveloped, negative-strand RNA virus that belongs to the Vesiculovirus genus of the Rhabdovirus family. It is an arbovirus which can infect insects, cattle, horses, and pigs. In mammals, its ability to infect and kill tumor cells, although sparing normal cells makes it a promising oncolytic virus for the treatment of cancer^{1–3}. VSV genome encodes five structural proteins among which a single-transmembrane glycoprotein (G). G plays a critical role during the initial steps of virus infection⁴. First, it is responsible for virus attachment to specific receptors. After binding, virions enter the cell by a clathrin-mediated endocytic pathway^{5,6}. In the acidic

environment of the endocytic vesicle, G triggers the fusion between the viral and endosomal membranes, which releases the genome in the cytosol for the subsequent steps of infection. Fusion is catalyzed by a low-pH-induced large structural transition from a pre toward a post-fusion conformation, which are both trimeric^{7,8}.

The polypeptide chain of G ectodomain folds into three distinct domains which are the fusion domain (FD), the pleckstrin homology domain (PHD), and the trimerization domain (TrD). During the structural transition, the FD, the PHD, and the TrD retain their tertiary structure. Nevertheless, they undergo large

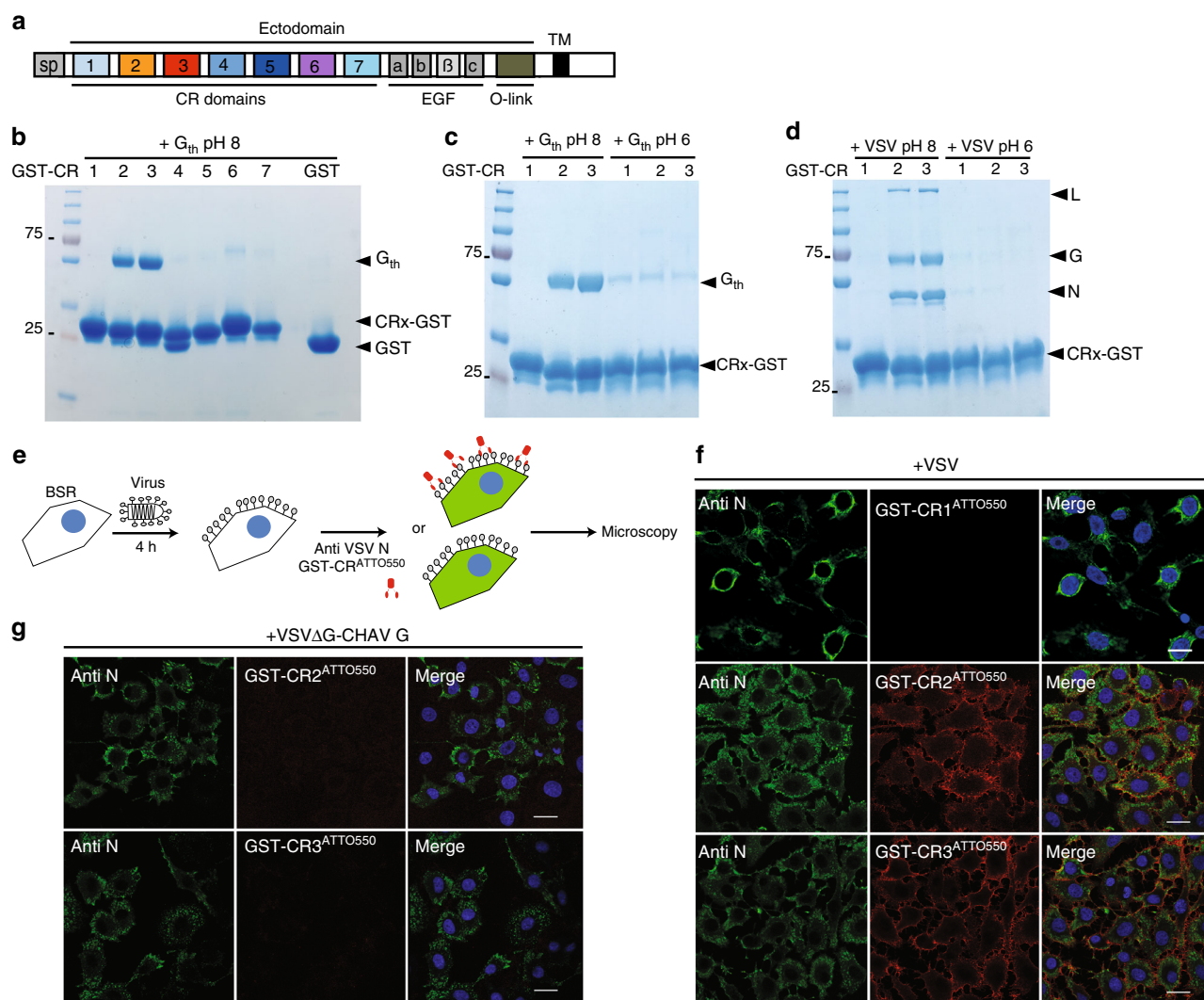


Fig. 1 VSV G interacts specifically with CR2 and CR3 in its pre-fusion conformation. **a** Scheme of the modular organization of the LDL-R indicating the 7 CR modules (1–7), the 3 EGF repeats (a, b and c), the seven-bladed β -propeller domain (β) of the epidermal growth factor precursor like domain (EGF), and the C-terminal domain containing O-linked oligosaccharides (O-link). SP signal peptide, TM transmembrane domain. **b** SDS-PAGE analysis of interaction experiments between the 7 GST-CR proteins, bound to GSH magnetic beads, and G_{th} at pH 8. **c**, **d** Coomassie-stained SDS-PAGE of interaction experiments between GST-CR1, GST-CR2 and GST-CR3, bound to GSH magnetic beads, and G_{th} (**c**) or VSV (**d**) at pH 8 and 6, respectively. Purified GST-CR bound to GSH magnetic beads were incubated with either G_{th} or VSV in the appropriate pH condition in presence of Ca^{2+} for 20 min at 4 °C. Then, after wash, the beads were directly loaded on a gel. As a control in **b**, GST alone bound to the GSH coated beads was incubated in presence of G_{th} . **e** Cartoon that illustrates the experiments presented in **f** and **g**. After 4 h of infection, BSR cells were labeled with an antibody directed against VSV nucleoprotein (anti-VSV N) to visualize the infection (green fluorescence) and a GST-CR^{ATTO550} to probe CR domain recognition by the surface displayed glycoprotein (red fluorescence). **f** Labeling of G at the surface of BSR cells infected with VSV using fluorescent GST-CR1^{ATTO550}, GST-CR2^{ATTO550}, and GST-CR3^{ATTO550}. At 4 h post-infection (p.i.), cells were incubated with the appropriate GST-CR^{ATTO550} at 4 °C during 30 min prior fixation and permeabilization and then immuno-labeled using an anti-VSV N antibody to visualize the infection. **g** Labeling of CHAV G at the surface of BSR cells infected with a recombinant VSV expressing CHAV G (VSV Δ G-CHAVG) using fluorescent GST-CR2^{ATTO550} and GST-CR3^{ATTO550}. Infected cells are labeled using anti-VSV N antibodies. In **f** and **g**, DAPI was used to stain the nuclei. Scale bars=20 μ m

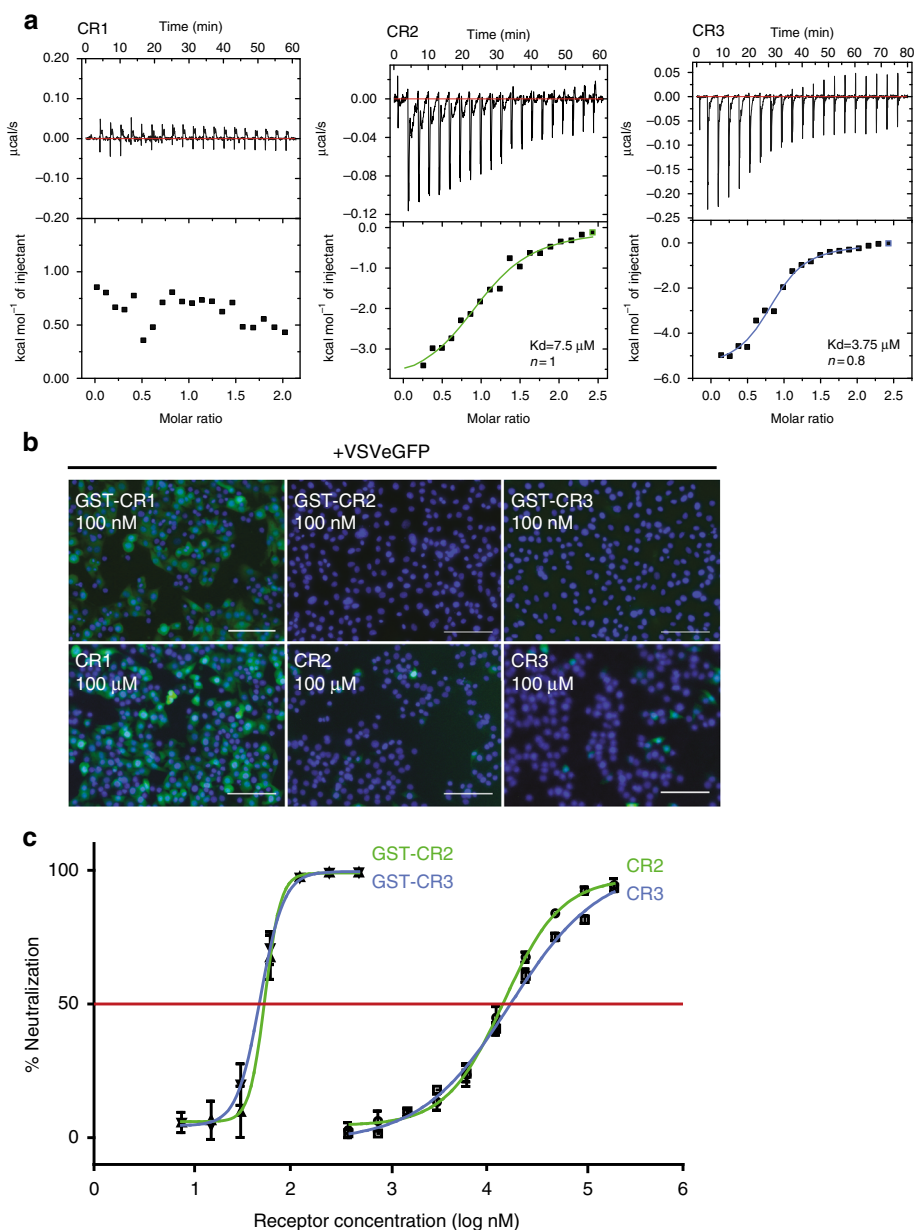


Fig. 2 Characterization of VSV G-CR2 and VSV G-CR3 interaction **a** Isothermal titration calorimetry (ITC) analysis between G_{th} and CR1, G_{th} and CR2, G_{th} and CR3 at 20 °C. Representative plots of each ITC experiments are illustrated with raw data in the upper panel. Binding parameters were determined by curve fitting analysis with the single-site binding model. The values indicated in the panel are those corresponding to the curves that are presented. K_d values given in the text are means of three independent experiments \pm standard errors. **b, c** Inhibition of VSV infection by soluble forms of CR domains. **b** BSR cells were infected with VSV-eGFP preincubated with GST-CR1, GST-CR2, GST-CR3 (upper part), CR1, CR2, or CR3 monovalent domains (lower part) at the indicated concentrations. Cells were fixed 4 h p.i. Only infected cells are expressing eGFP. Note that neither CR1 nor GST-CR1 construction protect cells from infection. DAPI was used to stain the nuclei. Scale bars = 100 μm . **c** VSV-eGFP was preincubated with increasing concentrations of GST-CR2, GST-CR3, CR2, or CR3 monovalent domains. At 4 h p.i., the percentage of infected cells was determined by counting the number of cells expressing eGFP using a flow cytometer. The percentage of neutralization was equal to $100 \times [1 - (\% \text{ of infected cells in presence of CR}) / (\% \text{ of infected cells in the absence of CR domains})]$. Data depict the mean with standard error for experiments performed in triplicate

rearrangements in their relative orientation due to secondary changes in hinge segments (S1 to S5), which refold during the low-pH induced conformational change^{7–10}.

VSV G has been widely used for pseudotyping other viruses^{11–13} and VSV-G-pseudotyped lentiviruses (VSV-G-LVs) exhibit the same broad tropism as VSV. Recently it has been shown that low-density lipoprotein receptor (LDL-R) and other members of this receptor family serve as VSV receptors¹⁴. This result explains why VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated

T cells, B cells, and hematopoietic stem cells, as they have a very low expression level of LDL-R¹⁵.

The LDL-R is a type I transmembrane protein which regulates cholesterol homeostasis in mammalian cells¹⁶. LDL-R removes cholesterol carrying lipoproteins from plasma circulation. Ligands bound extracellularly by LDL-R at neutral pH are internalized and then released in the acidic environment of the endosomes leading to their subsequent lysosomal degradation. The receptor then recycles back to the cell surface. LDL-R ectodomain is

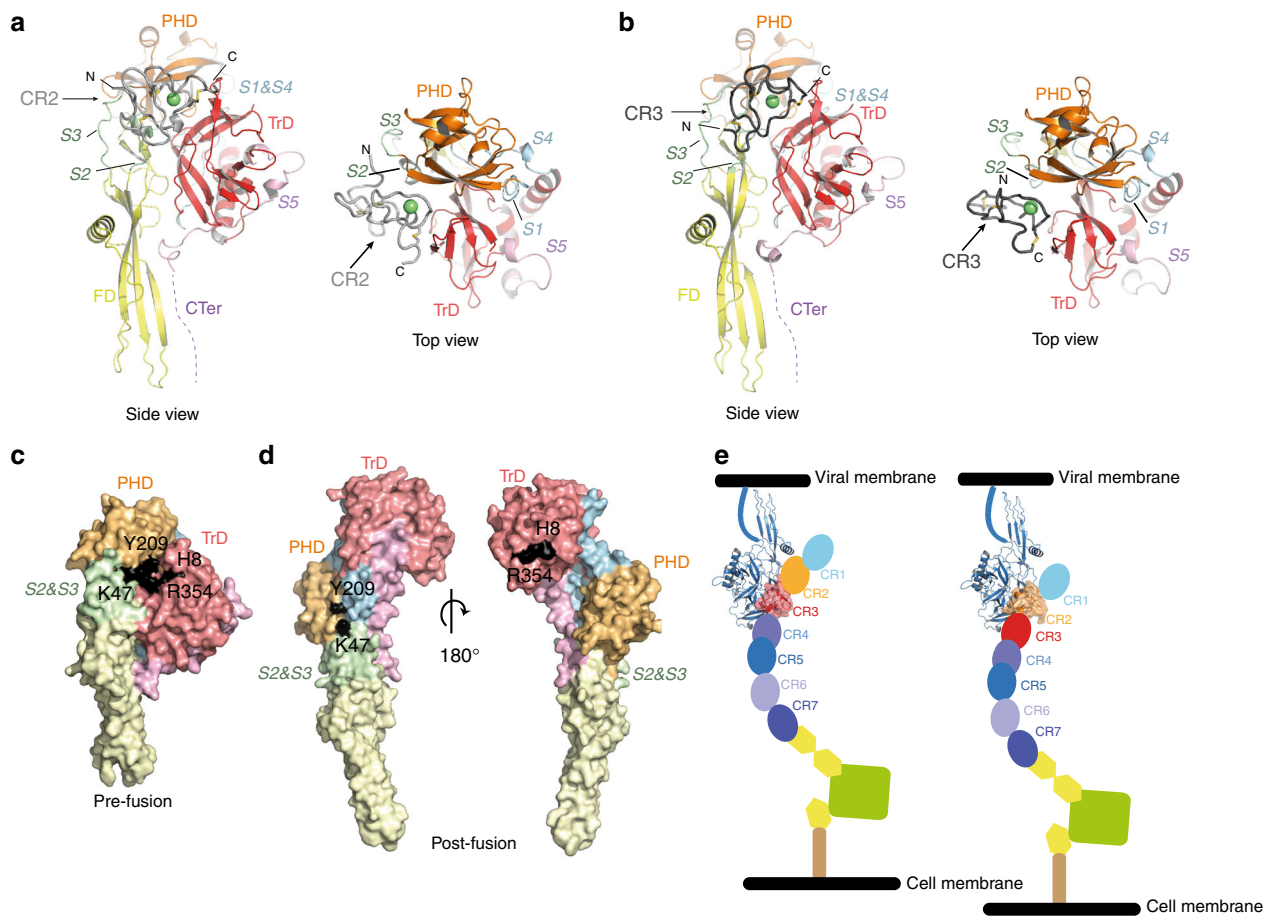


Fig. 3 X-ray structures of G_{th} -CR2 and G_{th} -CR3 complexes **a, b** Overview of G_{th} -CR2 (**a**) and G_{th} -CR3 (**b**) crystalline structures in ribbon representation. G is depicted by domains and CR domains are in two shades of gray. The conserved disulfide bonds of each CR that maintain their secondary structure are in yellow. In both complexes the CR domain is nested in the same cavity of G. N and C-terminal extremities of each CR are indicated. Color code for G_{th} : the trimerization domain (TrD) is in red, the pleckstrin homology domain (PHD) is in orange, the fusion domain (FD) is in yellow. Those domains are connected by segments (S1 to S4) which refold during conformational change: segments S1 and S4 are in cyan, segments S2 and S3 are in green, S5 and the C-terminal segment (CTer) are in purple. The calcium ion of the CR domains is depicted as a green sphere. **c** Footprint of CR2 domain on G pre-fusion conformation. G is in full atoms view and depicted by domains. Residues of G that establish contacts with CR are shown in black on the surface of the protein. **d** Location of residues interacting with CR domains on G post-fusion conformation. Two views at 180° are shown. Note that the interaction patch is scattered when G is in this conformation. **e** Scheme showing the two complexes that can be formed between VSV G and LDL-R. At the cell surface, at neutral pH, the LDL-R adopts an open extended conformation¹⁹ and VSV G can bind either CR2 or CR3. Note that the LDL-R in this extended conformation has the appropriate orientation to interact with G anchored in the viral membrane

composed of a ligand-binding domain, an epidermal growth factor (EGF) precursor homology domain and a C-terminal domain enriched in O-linked oligosaccharides. The ligand binding domain is made of 7 cysteine-rich repeats (CR1 to CR7, Fig. 1a and Supplementary Fig. 1). Each repeat is made of approximately 40 amino acids and contains 6 cysteine residues, engaged in 3 disulfide bridges, and an acidic residues cluster that coordinates a Ca^{2+} ion¹⁷. The intracellular release of the cargo is driven by a low-pH-induced conformational change of LDL-R from an open to a closed conformation (Supplementary Fig. 1)^{17–19}.

The LDL-R gene family consists of trans-membrane receptors that reside on the cell-surface, are involved in endocytic uptake of lipoproteins, and require Ca^{2+} for ligand binding. All these receptors have in common several CR repeats (up to several tens), EGF precursor-like repeats, a membrane-spanning region and an intracellular domain containing at least one internalization signal sequence²⁰. They are found ubiquitously in all animals including insects²¹.

Here we show that VSV G is able to independently bind two distinct CR domains (CR2 and CR3) of LDL-R and we report crystal structures of VSV G in complex with those domains. The structures reveal that the binding sites of CR2 and CR3 on G are identical. We show that HAP-1 cells in which the LDL-R gene has been knocked out are still susceptible to VSV infection confirming that VSV G can use receptors other than LDL-R for entry. However, mutations of basic residues, which are key for interaction with LDL-R CR domains, abolish VSV infectivity in mammalian, as well as insect cells. This indicates that the only receptors of VSV in mammalian and in insect cells are members of the LDL-R family and that VSV G has specifically evolved to interact with their CR domains.

Results

LDL-R CR2 and CR3 bind G and neutralize viral infectivity.

We have expressed individually each LDL-R CR domain in fusion with the glutathione S-transferase (GST) in *Escherichia coli*. Proteins were solubilized in the presence of sarkosyl (acting as a

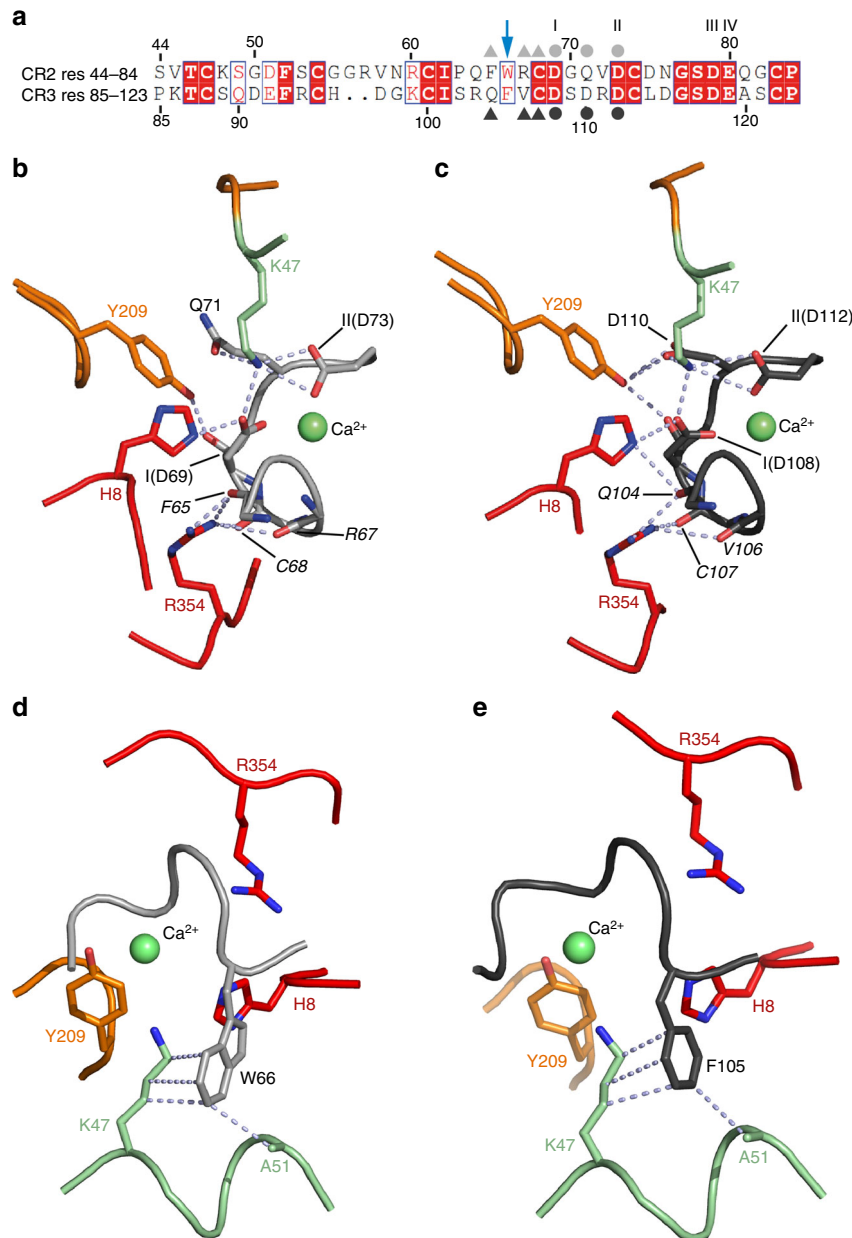


Fig. 4 Molecular basis of G/CR interaction. **a** Sequence alignment of LDL-R CR2 and CR3. Conserved residues are in a red box and similar residues are shown by red letters boxed in blue. Acidic residues involved in the binding of the Ca^{2+} ion are indicated by I, II, III, and IV. CR residues involved in polar contacts with G are labeled with gray symbols (light gray for CR2 and dark gray for CR3; dots when the contact is established via the lateral chain and triangles when the contact is established via the main chain) on each CR sequence. The aromatic residue which protrudes from the CR modules and establishes hydrophobic interactions with G is indicated by a blue arrow. **b, c** Close-up view on the G_{th} -CR interface showing the docking of G basic residues on the acidic patch of both CR2 (**b**) and CR3 (**c**). In both cases, the same G residues (H8, K47, Y209, and R354) are involved in the interaction. Residues labels on each CR domain are in italic letters when the contact is established via the main chain; putative bonds are shown as light blue dashed lines. **d, e** Close-up view on the G_{th} -CR interface showing the hydrophobic interactions between the aromatic residue W66 of CR2 (**d**) and F105 of CR3 (**e**) and residues K47 and A51 of G. The color code is the same as in Fig. 3a and b

mild denaturing agent), DTT and Ca^{2+} and renatured by dilution in a Ca^{2+} containing buffer. The presence of Ca^{2+} was mandatory for correct folding of the proteins. Individual CR domains were then obtained by cleavage of the GST tag by precision protease. All purified CR domains behave similarly in gel filtration experiments (Supplementary Fig. 2).

Each fusion protein was incubated at pH 8 with magnetic beads coated with glutathione before addition of a soluble form of the ectodomain of G (VSV G_{th} , amino acid (AA) residues 1–422, generated by thermolysin limited proteolysis of viral particles²²)

(Fig. 1b). After 20 min of incubation at 4 °C, the beads were washed and the associated proteins were analyzed by SDS/PAGE followed by Coomassie blue staining. This revealed that only CR2 and CR3 domains are able to directly bind VSV G (Fig. 1b) at pH 8. These results are consistent with previous data indicating that a monoclonal antibody (Mab) directed against LDL-R CR3 almost completely inhibited the VSV-triggered cytopathic effect which was not the case with a Mab directed against LDL-R CR6¹⁴. The binding of G_{th} or VSV to fusion proteins GST-CR2 and GST-CR3 was pH dependent and no interaction was detected at pH 6

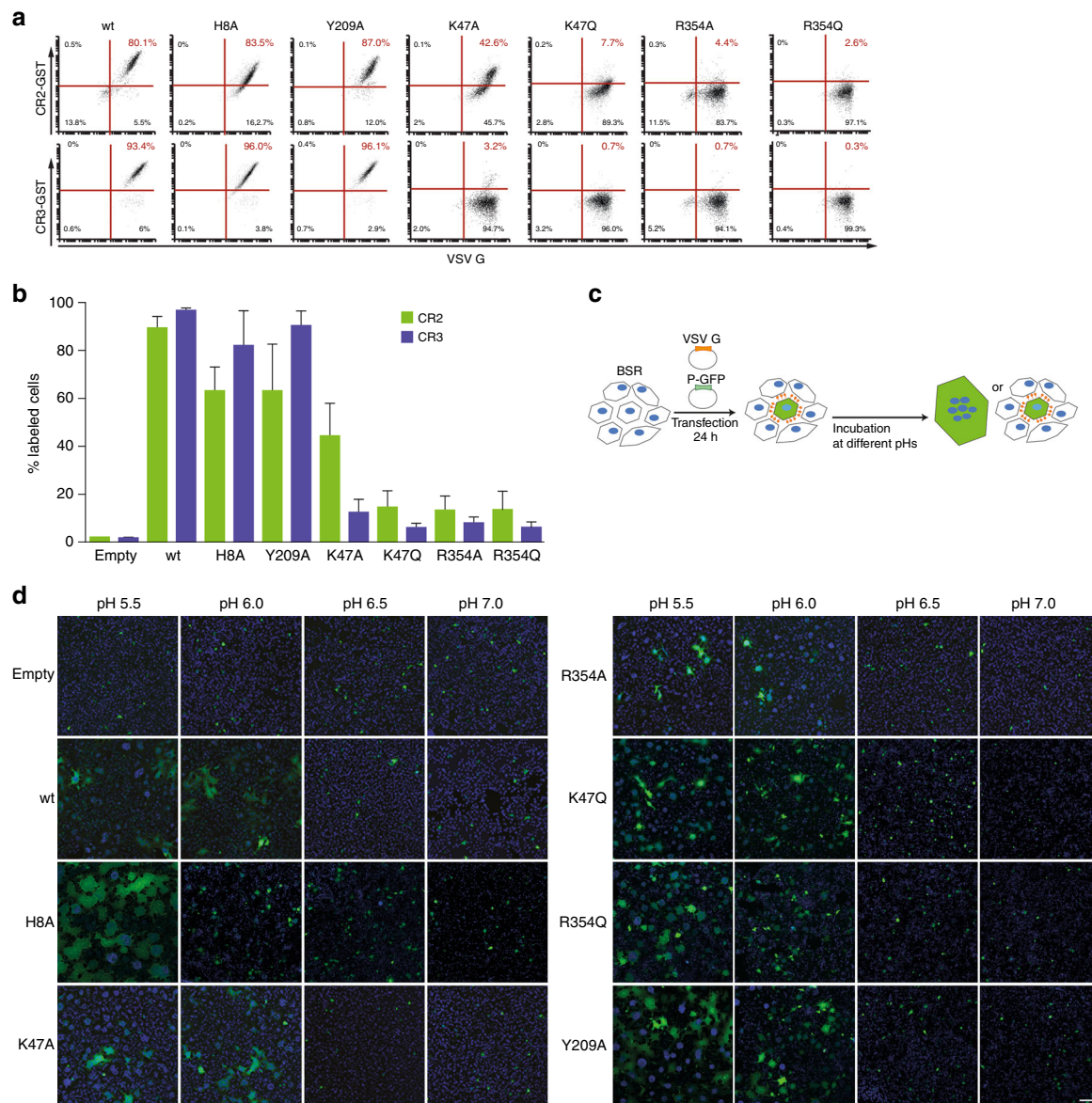


Fig. 5 K47 and R354 on G are crucial for interaction with CR domains but not required for fusion. **a** Flow cytometry analysis of the expression of WT and mutant glycoproteins at the surface of HEK293T cells and of the binding of fluorescent GST-CR2 (top) and GST-CR3 (bottom). After 24 h of transfection, cell surface expression of WT and mutant G was assessed using monoclonal anti-G antibody 8G5F11 directly on living cells at 4 °C during 1 h. Cells were then incubated simultaneously with anti-mouse Alexa fluor 488 and the indicated GST-CR^{ATTO550}. Cells transfected with a G construct that was still able to bind GST-CR proteins exhibited red fluorescence due the ATTO⁵⁵⁰ dye. In each plot, the percentage of ATTO⁵⁵⁰ positive cells is indicated. **b** WT and mutant G ability to bind CR domains. The histogram indicates the mean percentage of ATTO⁵⁵⁰ positive cells for each point mutation on G ($n=3$). The error bars represent the standard deviation. **c** Cartoon describing the cell-cell fusion assay. BSR cells are co-transfected with plasmids expressing VSV G (either WT or mutant G) and P-GFP. After 24 h of post-transfection cells are exposed for 10 min to media adjusted to the indicated pH which is then replaced by DMEM at pH 7.4. The cells are then kept at 37 °C for 1 h before fixation. Upon fusion, the P-GFP diffuses in the syncytia. **d** Cell-cell fusion assay of WT and mutant glycoproteins. Scale bar=200 μ m

(Fig. 1c, d) suggesting that only G pre-fusion conformation is able to bind LDL-R. Finally, GST-CR2 and GST-CR3 (but not GST-CR1) fluorescently labeled with ATTO⁵⁵⁰ (Fig. 1e) specifically recognized VSV G expressed at the surface of infected cells but not the glycoprotein of Chandipura virus (CHAV, another vesiculovirus), which shares 40% AA identity with VSV G (Fig. 1f, g). We also used isothermal titration calorimetry (ITC) to investigate the binding parameters of CR1, CR2, and CR3 to G_{th} in solution (Fig. 2a). Here again, no interaction between G_{th} and CR1 was detected. On the other hand, for both CR2 and CR3, the binding reactions appear to be exothermic, show a

1:1 stoichiometry and exhibit similar K_d s in the micromolar range ($4.3 \pm 1 \mu$ M for CR3 and $7.3 \pm 1.5 \mu$ M for CR2, mean \pm SEM of three independent experiments).

Recombinant soluble CR2 and CR3 domains, either alone or in fusion with GST, are also able to neutralize viral infectivity when incubated with the viral inoculum prior infection (Fig. 2b). In order to determine the IC₅₀ of the different constructions, we incubated 5×10^4 VSV-eGFP infectious particles with serial dilutions of GST-CR2, GST-CR3, CR2 or CR3. After 15 min, the mixtures were transferred onto 2×10^4 BSR cells for 30 min of adsorption. After 4 h, the percentage of infected cells (i.e.,

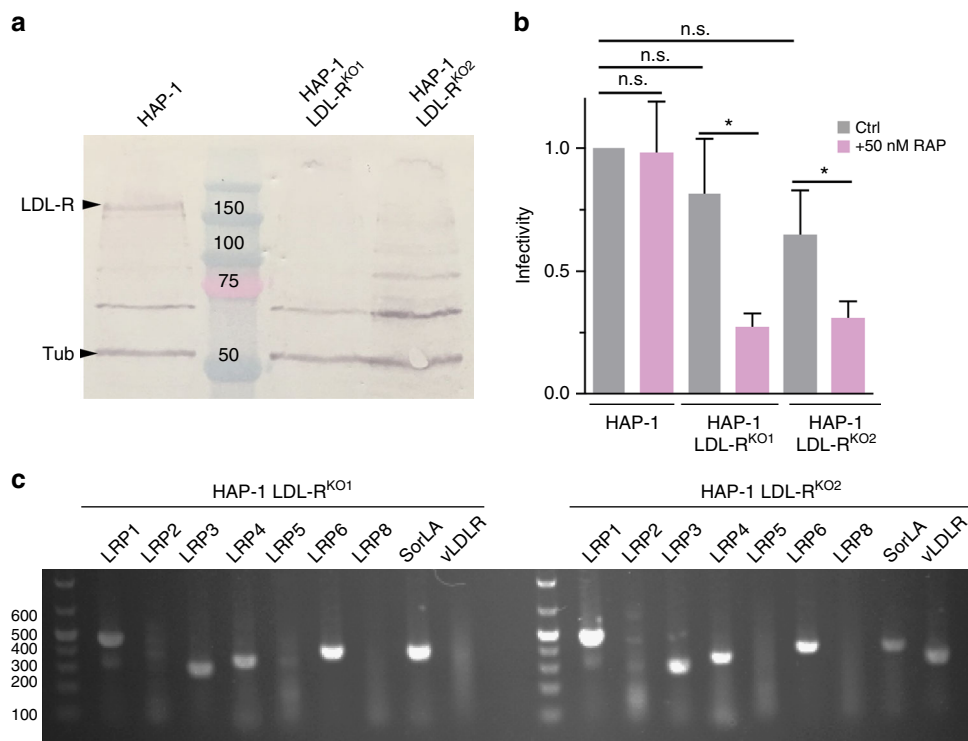


Fig. 6 LDL-R presence on the cell surface is not mandatory for VSV infection. **a** Analysis of LDL-R expression in wild-type HAP-1, HAP-1 LDL-R^{KO1} and HAP-1 LDL-R^{KO2} cells. The immunoblot was performed on crude cell extracts and revealed with chicken anti LDL-R (GW22458A from Sigma). α -Tubulin (tub) was also immunoblotted as a loading control. The LDL-R band migrates with an apparent MW of 150 kDa due to the presence of glycosylation sites (predicted MW without oligosaccharides is 95 kDa). **b** Effect of the RAP protein on the susceptibility of LDL-R deficient HAP-1 cells to VSV-eGFP infection. VSV-eGFP was used to infect HAP-1 and HAP-1 LDL-R^{KO} cells in the presence or not of RAP (50 nM). Infectivity was determined by counting the number of cells expressing eGFP using a flow cytometer. Data depict the mean with standard deviation for experiments performed in triplicate. *p* values were determined using an unpaired Student's *t* test (**p* < 0.05; n.s. non-significant). **c** Expression of LDL-R family members in HAP-1 LDL-R^{KO} cell lines evaluated by RT-PCR

expressing the eGFP) was determined by flow cytometry. For both CR2 and CR3, the IC₅₀ is about 15 μ M and decreases to about 20 nM when fusion GST-CR constructions are used, thanks to their dimeric nature which induces avidity-enhanced binding to the viral glycoproteins (Fig. 2c).

Crystal structures of G_{th} in complex with LDL-R CR domains.

We crystallized G_{th} in complex with either CR2 or CR3. The crystal of the complex G_{th}-CR3 (diffracting up to 3.6 Å) belongs to space group P622. In this crystal form, the lattice organization of G_{th} molecules is identical to that of the crystal of G_{th} alone in pre-fusion state⁸ (Supplementary Fig. 3B). On the other hand, the G_{th}-CR2 crystal form (diffracting up to near 2.2 Å) belongs to the H32 space group (Supplementary Fig. 3A).

The binding site of CR domains on G is the same in both crystal forms (Fig. 3a, b). CR2 (resp. CR3) interaction with G buries 1590 Å² (resp. 1450 Å²) of the two molecules' surfaces. It is essentially constituted by segments going from residues 8 to 10 and 350 to 354 in the trimerization domain (TrD), 180 to 184 in the pleckstrin homology domain (PHD) and 47 to 50 in segment S2. Those three segments are rearranged in G post-fusion conformation⁷, which explains the inability of CR domains to bind G at low pH (Fig. 3c, d). It is worth noting that the orientation of CR domains in both complexes is optimal for the interaction between G and the open conformation of LDL-R when both proteins are anchored in their respective membranes (Fig. 3e).

Two basic residues of G (H8 from the TrD and K47 from PHD) are pointing toward two acidic residues which belong to

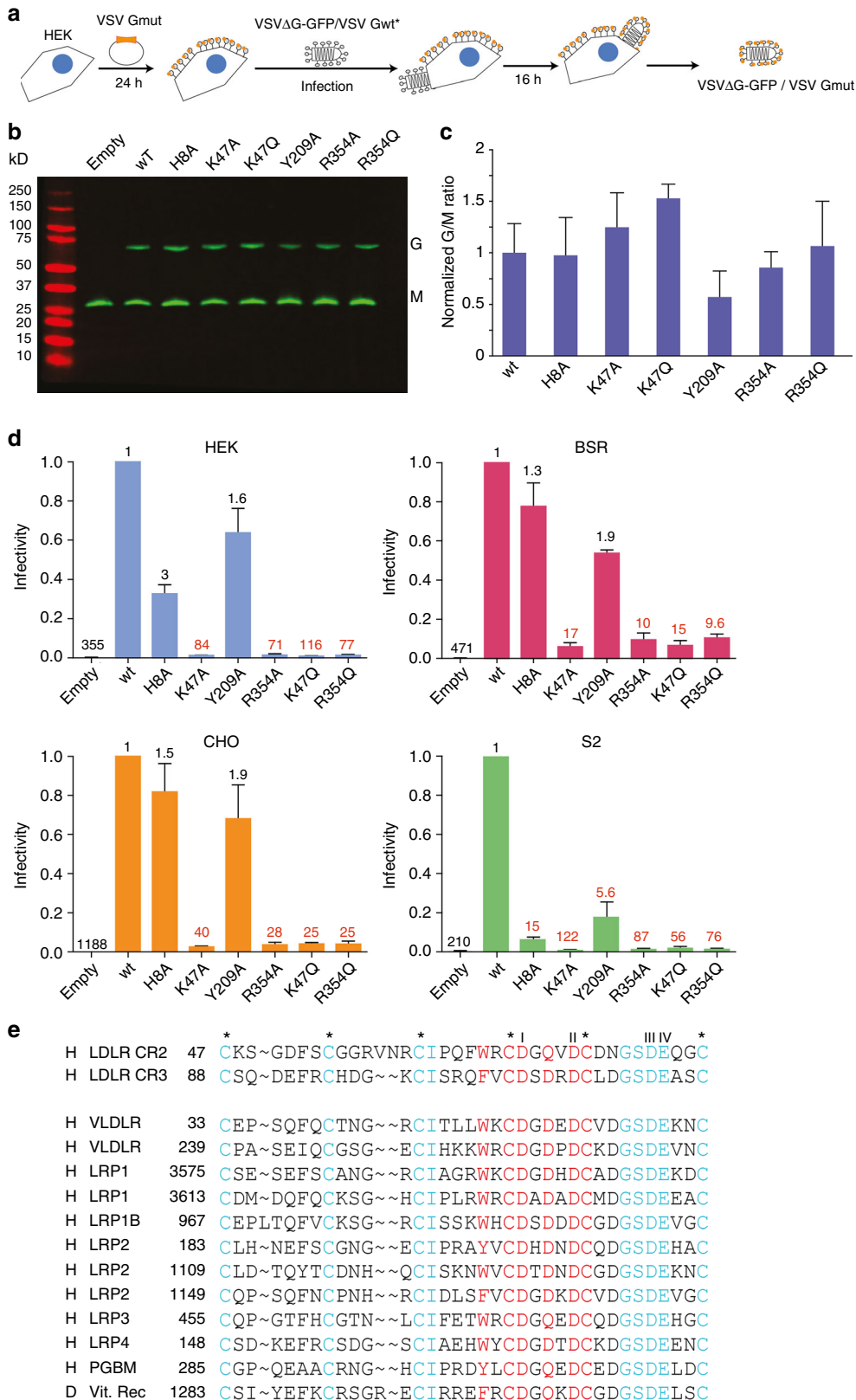
the octahedral calcium cage of the CR domains (D69 and D73 on CR2; D108 and D112 on CR3 labeled I and II—Fig. 4a). The side chain of K47 also establishes an H-bond with the amide group of Q71 (in CR2) and a salt bridge with the acidic group of D110 (in CR3). Two other residues, Y209 (which makes hydrogen bonds with the C=O group of D69 on CR2, and with the C=O group of D108 and the carboxyl group of D110 on CR3) and R354 (which establishes contacts with the main chain of both CR domains), seem also to be key for the interaction (Fig. 4b, c). In both CR domains, the side chain of an aromatic residue (W66 in CR2 and F105 in CR3), which protrudes from the receptor module, also contributes to the stability of the complex by establishing hydrophobic interactions with the aliphatic part of K47 side chain and with the side chain of A51 of G (Fig. 4d, e).

K47 and R354 of G are crucial for LDL-R CR domains binding.

To investigate their contribution to LDL-R CR domains binding, we mutated residues H8, K47, Y209, and R354 of G into an alanine or a glutamine. HEK cells were transfected with pCAGGS plasmids encoding wild-type or mutant VSV G glycoproteins (WT, H8A, K47A, K47Q, Y209A, R354A, and R354Q). After 24 h of post-transfection, the cells were incubated with MAb 8G5F11 directed against G ectodomain. Then, green fluorescent anti IgG secondary antibodies and GST-CR proteins fluorescently labeled with ATTO⁵⁵⁰ were simultaneously added. Immunofluorescence labeling indicated that WT and all G mutants are efficiently transported to the cell surface (Fig. 5a). Mutants H8A and Y209A bind GST-CR proteins as WT G whereas the other mutants are

affected in their binding ability (Fig. 5a, b). Mutants K47Q, R354A and R354Q bind neither GST-CR2 nor GST-CR3. Finally, although no interaction is detected between mutant K47A and CR3, a residual binding activity is observed between this mutant and CR2 (Fig. 5a, b).

We also checked the fusion properties of all the mutants (Fig. 5c). For this, BSR cells were transfected with pCAGGS plasmids encoding wild-type or mutant VSV G glycoproteins. The cells expressing mutant G protein have a fusion phenotype similar to that of WT G (Fig. 5d). This confirms that the mutant glycoproteins are correctly folded and demonstrates



that it is possible to uncouple G fusion activity and receptor recognition.

Other LDL-R family members are alternative receptors of VSV. We infected two HAP-1 cell-lines (HAP-1 LDL-R^{KO1} and HAP-1 LDL-R^{KO2}) in which the LDL-R gene has been knocked out (Fig. 6a and Supplementary Fig. 4). Both were as susceptible to VSV infection as WT HAP-1 cells (Fig. 6b). This demonstrates that VSV receptors other than the LDL-R are present at the surface of HAP-1 cells.

To evaluate the role of other LDL-R family members²³ as VSV receptors, we took advantage of the properties of the receptor-associated protein (RAP), a common ligand of all LDL-R family members^{24–26} which blocks ligand binding to all LDL-R family members with the exception of LDL-R itself^{14,26}. RAP significantly inhibits VSV infection in HAP-1 LDL-R^{KO} cell lines but not in WT HAP-1 cells (Fig. 6b). Those results are consistent with previous data suggesting that VSV can use other LDL-R family members as alternative receptors¹⁴. Indeed, RT-PCR on purified RNA revealed the expression of several LDL-R family members including LRP1, LRP3, LRP4, LRP6, and sortilin (SorLA) in both HAP-1 LDL-R^{KO} cell lines. Messengers corresponding to the vLDL-R were only detected in HAP-1 LDL-R^{KO2} (Fig. 6c).

G mutants affected in CR binding cannot rescue VSVΔG-GFP.

We then examined whether the mutant glycoproteins described above are able to sustain viral infection. We used a recombinant VSV (VSVΔG-GFP) in which the G envelope gene was replaced by the green fluorescent protein (GFP) gene and which was pseudotyped with the VSV G glycoprotein^{27,28}. This pseudotyped recombinant was used to infect HEK cells either transfected or not transfected by a plasmid encoding WT or mutant glycoproteins²⁹. After 16 h, the infected cells supernatant was collected (Fig. 7a). Mutant glycoproteins incorporation into the envelope of the particles present in the supernatant was verified by western blot (Fig. 7b, c) and the infectivity of the pseudotyped particles was analyzed in different cell lines (mammalian HEK, BSR, CHO and Drosophila S2 cells) by counting the cells expressing GFP by flow cytometry 4 h p.i. (Fig. 7d). Mutants K47A, K47Q, R354A, and R354Q did not rescue the infectivity of VSVΔG-GFP. Compared to WT G, the infectivity decreased by a factor of 10 up to 120 (Fig. 7d). The decrease was more important in HEK and S2 cell lines than in the two hamster cell lines. In mammalian cell lines, mutants H8A and Y209A can rescue the infectivity of VSVΔG-GFP at a level similar to that of WT. This is not the case in S2 cell line, where their infectivity significantly decreased (by a factor of 15 for mutant H8A and ~6 for Y209A) (Fig. 7d).

As the fusion activity of the mutants is unaffected (Fig. 5d), the loss of infectivity of pseudotypes bearing a mutant glycoprotein can be safely attributed to their disability to recognize a cellular receptor. These results indicate that mutants K47A, K47Q, R354A, and R354Q which are unable to bind LDL-R CR domains are also severely impaired in their ability to bind other VSV receptors.

Discussion

LDL-R has been demonstrated to be the major entry port of VSV and lentivirus pseudotyped by VSV G¹⁴. Here, we demonstrate that VSV G is able to bind two CR domains of the LDL-R with similar affinities. The biological relevance of this interaction was demonstrated by the ability of both CR2 and CR3 to inhibit VSV infection. The crystal structures of VSV G in complex with CR2 and CR3 reveal that they both occupy the same site at the surface of the glycoprotein in its pre-fusion conformation and that the same G residues ensure the correct anchoring of the CR domains. This binding site is split apart when G is in its post-fusion conformation, which explains why G is unable to bind CR domains at low pH. This may disrupt the interaction between G and LDL-R in the acidic endosomal lumen and favor the transport of the virion to an appropriate fusion site.

CR domain recognition by VSV G involves basic residues H8 and K47, pointing toward the calcium-coordinating acidic residues, and R354 which interacts with C=O groups of the main chain. This mode of binding is very similar to what is observed for endogenous ligand recognition by CR domains of the LDL-R family members^{17,30,31} and, indeed, mutant glycoproteins in which either K47 or R354 is replaced by an alanine or a glutamine, are unable to bind CR domains. It is worth noting that those key residues are not conserved among vesiculoviruses. Therefore, the use of LDL-R as a viral receptor cannot be generalized to the other members of the genus. Indeed, we have shown that CHAV G, which does not possess basic residues in positions corresponding to VSV residues 47 and 354, does not bind CR domains.

VSV G binds only CR2 and CR3. All CR domains have the same fold and all form a calcium cage involving conserved acidic residues. The acidic residues in position I and II, which play a key role in the interaction with G, are conserved except in CR7 which has an asparagine in position I (Supplementary Fig. 1). Therefore, they are poorly discriminant for the interaction between a given CR domain and G. Similarly, residue R354 of G interacts with the main chain of both CR2 and CR3 and the influence of CR domains amino acid sequence on this interaction is difficult to predict. However, the aromatic residues (W66 in CR2 and F105 in CR3) establishing hydrophobic interactions with the aliphatic

Fig. 7 Infectivity of VSVΔG-GFP virus pseudotyped with mutated G in various cell types. **a** Generation of VSVΔG-GFP virus pseudotyped with VSV G mutants. Transfected HEK-293T expressing mutant G were infected with VSVΔG-GFP pseudotyped with VSV G WT. After 16 h, VSVΔG-GFP virions pseudotyped with mutant VSV G were harvested. **b, c** Incorporation of WT and mutant G in VSVΔG-GFP viral particles. VSVΔG-GFP pseudotyped with the WT VSV G was used to infect HEK-293T (MOI=1) transfected with indicated mutants. After 16 h, viral supernatants were analyzed by Western blot (using an anti-VSV G and an anti-VSV M antibody) (**b**). For each mutant, the G/M ratio was compared to that of WT normalized to 1. The mean of 3 independent experiments is shown with error bars representing the SD (**c**). **d** Infectivity of VSVΔG-GFP pseudotyped with WT and mutant glycoproteins. VSVΔG-GFP pseudotyped with WT VSV G was used to infect HEK-293T previously transfected with the indicated mutated glycoprotein (MOI 1). VSVΔG-GFP viruses pseudotyped by WT or mutant glycoproteins were used to infect indicated cell lines during 4 h; the percentage of infected cells was determined by counting GFP expressing cells by flow cytometry. Data depict the mean with SD for three independent experiments. Above each bar, the reduction factor of the titer (compared to VSVΔG-GFP pseudotyped by WT G which was normalized to 1) is indicated. **e** Sequence alignment of human (h) and drosophila (d) CR domains having characteristics similar to human LDL-R CR2 and CR3. Besides scaffolding residues of the CR fold (i.e., the 6 cysteines, labeled by stars, and the four acidic residues—I, II, III, IV—forming the calcium octahedral cage), we imposed (i) the absence of insertion or deletion in the contact region, (ii) an aromatic residue corresponding to W66 of CR2, and (iii) an amidic or an acidic amino acid in place corresponding to residue Q71 of CR2. PGBM: Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein. Vit.Rec: Putative vitellogenin receptor. Numbering of residues corresponds to that of the mature protein for CR2 and CR3 and to the precursor in all other instances (i.e., including the signal peptide)

part of K47 side chain and with the side chain of A51 of G are not conserved and are replaced by an arginine in CR6 and a lysine in CR7 (Supplementary Fig. 1). Also, instead of an amide or an acidic amino acid in place corresponding to residue Q71 in CR2 and D110 in CR3 (which interacts with the side chain of K47), a serine is found in CR1, a glycine in CR5 and an alanine in CR7 (Supplementary Fig. 1). All those considerations may explain why we do not observe G binding to CR1, CR5, CR6 or CR7. The question remains opened for CR4.

Our functional analysis confirms that LDL-R is not the only receptor of VSV¹⁴ as HAP-1 LDL-R^{KO} can be infected as efficiently as HAP-1 cells. However, the mutant glycoproteins which are unable to bind CR domains cannot restore VSVΔG-GFP infectivity neither in mammalian nor in insect cells. The most parsimonious interpretation of this result is that the only receptors of VSV are members of the LDL-R family or other transmembrane proteins containing CR domains. The molecular basis of the interaction is the same for all those receptors and involves G ability to bind their CR domains. This is in agreement with the decrease of infectivity observed in presence of RAP protein which is an antagonist of other members of the LDL-R family²⁶.

Indeed, a systematic search of CR domains having similar characteristics to CR2 and CR3 (i.e. besides the common characteristics of the CR domains, they must have no insertion or deletion in the contact region, an aromatic residue corresponding to W66 of CR2 to interact with the aliphatic part of K47, and an amide or an acidic amino acid in place corresponding to residue Q71 of CR2) reveals two such CR domains in VLDL-R, two in LRP1, one in LRP1B, three in LRP2, one in LRP3, one in LRP4, one in PGBM (Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein) in humans. In *Drosophila*, we found a single CR domain with those characteristics in the putative vitellogenin receptor (Fig. 7e).

Overall this study demonstrates that VSV G has specifically evolved to interact with CR domains of the members of the LDL-R family. The ubiquitous nature of this receptor family (which is also widespread among invertebrates) explains the pantropism of VSV. Other proteins from other families (such as the corin, which is a transmembrane serine protease³²) also contain CR domains. However, their CR domains do not seem to have the correct characteristics to interact with G (and are not retrieved in our systematic search). Furthermore, corin is a type II membrane protein imposing an opposite orientation of CR domains, a feature which may also impede G binding.

The LDL-R family members are involved in entry of several viruses belonging to different families. Among them are some human rhinoviruses (HRV)³³ and hepatitis C virus^{34,35}. The crystal structure of a complex between the third CR module of the very low-density lipoprotein receptor and HRV2 reveals that the attachment site on the virus involves a conserved lysine residue pointing toward the calcium cage³⁶. Similarly to VSV G, the side chain of this lysine establishes hydrophobic interactions with a tryptophan residue of the CR module. This tryptophan corresponds to W66 on CR2 and F105 on CR3 of the LDL-R receptor (Fig. 4d, e). Therefore, the molecular basis of CR module recognition by HRV2 VP1 protein and VSV G are very similar. Furthermore, in the case of HRV2, the crystal structure and experimental data also indicated that different CR domains and different members of the family redundantly play the role of HRV2 receptors^{33,36}.

The demonstration that the receptors of VSV are all members of the LDL-R family together with the characterization of the molecular basis of CR domains recognition by G paves the way to develop recombinant VSVs with modified tropism. Indeed, a glycoprotein having (i) a point mutation which ablates the natural receptor tropism and (ii) an insertion of a protein domain or a

peptide targeting specifically a tumor cell³⁷ should allow the design of fully retargeted oncolytic VSVs. Such viruses should be able to eliminate cancerous cells while sparing normal ones.

Methods

Cells and viruses. BSR, a clone of BHK-21 (Baby Hamster Kidney cells; ATCC CCL-10) and HEK-293T (human embryonic kidney cells expressing simian virus 40T antigen; ATCC CRL-3216) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). HAP-1 wt and HAP-1 LDL-R deficient cells (HAP-1 LDL-R^{KO1}—catalog number: HZGHC003978c007—and HAP-1 LDL-R^{KO2}—catalog number: HZGHC003978c008—purchased from Horizon Discovery) were grown in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 10% FCS. CHO (cell line derived from Chinese hamster ovaries) cells were grown in Ham's F12 medium supplemented with 2 mM glutamine and 10% FCS. All mammalian cell lines were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. *Drosophila* S2 cells were grown in Schneider's medium supplemented with 10% FCS at 28 °C.

Wild-type VSV (Mudd-Summer strain, Indiana serotype), VSVΔG-GCHAV³⁸ and VSV-eGFP (a gift from Denis Gerlier) were propagated in BSR cells.

VSVΔG-GFP is a recombinant VSV which was derived from a full-length cDNA clone of the VSV genome (Indiana serotype) in which the coding region of the G protein was replaced by a modified version of the GFP gene and pseudotyped with the VSV G protein²⁹. VSVΔG-GFP was propagated on HEK-293T cells that had been previously transfected with pCAGGS-VSVG.

Plasmids and cloning. Point mutations were created starting from the cloned VSV G gene (Indiana Mudd-Summer strain) in the pCAGGS plasmid. Briefly, forward and reverse primers containing the desired mutation were combined separately with one of the primers flanking the G gene to generate two PCR products. These two G gene fragments overlap in the region containing the mutation and were assembled into the pCAGGS linearized vector using Gibson assembly reaction kit (New England Biolabs).

Antibodies. Chicken anti LDL-R (GW22458A, dilution: 1/500) and α-Tubulin (T6199, dilution 1/1000) were purchased from Sigma. Anti G (8G5F11, dilution 1/1000) was purchased from Kerfast. Goat anti-mouse Alexa fluor 488, purchased from ThermoFisher (A-11029, dilution 1/1000), were used as secondary antibodies. Goat anti-rabbit DyLight 800 conjugate (from Cell Signaling Technology, ref 5251, dilution 1/1000) was also used as a secondary antibody in western blot.

Protein expression, purification, and labeling. VSV G_{th} was obtained by limited proteolysis of viral particles and purified, as previously described²². Briefly, 4 volumes of concentrated virus (around 10 mg/ml) was thawed and incubated for 30 min at 37 °C with one volume of phosphate-citrate buffer at pH 6.3. A 1 mg/ml solution of thermolysin was applied directly on viral particles (with a ratio viral solution/thermolysin solution of 10/1 v/v) during 1 h at 37 °C for limited proteolysis. The reaction was stopped by addition of blocking buffer (900 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM EDTA, supplemented with a cocktail of protease inhibitors from Roche). Then, the soluble G ectodomain (G_{th}) was separated from the "shaved" viral particle by centrifugation at 13,000 g during 45 min. The supernatant was loaded on the top of a 20% sucrose, 20 mM Tris-HCl pH 8.8 cushion and spun for 50 min at 40,000 rpm in a SW55 rotor. The supernatant was diluted 10 times in Tris-HCl 10 mM pH 8.8 and loaded on a DEAE trisacryl column. G_{th} was eluted with 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.8 buffer. The eluted G_{th} was injected on a Superdex 200 HR10/30 column and eluted in 20 mM Tris-HCl pH 8.8 buffer. Fractions containing the G_{th} were pooled and concentrated with an amicon C/O 30 kDa ultrafiltration unit (Millipore).

As for the LDL-R, DNA sequences encoding the 7 CR domains of the human LDL-R (NM_000527, GenBank) were synthesized (MWG biotech) and subcloned in the pGEX-6P1 bacterial expression vector (Invitrogen). Each protein construct contains at its N-terminus a GST tag and a preScission protease cleavage site. Each CR domain was purified using the following protocol derived from ref. ³⁹. C41 bacteria transformed with the CR construct were cultured at 37 °C in LB-ampicillin medium until OD reached 0.6 AU. Protein expression was then induced with 1 mM IPTG during 5 h at 37 °C. Cells were sonicated in lysis buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM CaCl₂, 2% w/v sarkosyl and 1 mM DTT). The clarified supernatant was incubated with glutathione agarose beads (Thermo Fisher Scientific) in presence of 0.2% Triton X100 during 2 h. After incubation, beads were then extensively washed with equilibration buffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 8, 2 mM CaCl₂, 1 mM PMSF). The GST-CR construct was then eluted with the same buffer supplemented with 20 mM GSH. Purification of each GST-CR was achieved with a gel filtration step using a Superdex 200 column (Ge Healthcare). To isolate CR domains, purified GST-CR was incubated with preScission protease and injected on a gel filtration column Superdex 75 (Ge Healthcare). Fractions containing pure CR domains were then pooled, concentrated at 1 mM and stored at -80 °C until use.

One milligram of purified GST-CR2 (or GST-CR3) was labeled with the fluorescent dye ATTO⁵⁵⁰ NHS ester (Sigma Aldrich) using the instruction of the

manufacturer. The labeled proteins were then diluted at a concentration of 50 μM and stored at -80°C until use. The labeling ratio was estimated to be around 2 dyes per molecule.

Crystallization and structure determination. Initial crystallization screen was performed at 20°C by sitting drop vapor diffusion (100 nl protein and 100 nl mother liquor) in 96-well TTP plates (Corning) using a Mosquito robot.

Crystals of G_{th} in complex with CR2 domain were grown in hanging drops containing equal volumes (1 μL) of purified proteins and reservoir solution (29% PEG 3000, 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 200 mM LiSO_4). Crystals were observed after 2–3 days and matured to full size within a week. Crystals were soaked into mother liquor supplemented with 35% (v/v) glycerol for cryo-protection. Crystals were plunged into liquid nitrogen and measured at the SOLEIL synchrotron beam line PROXIMA-1. A data set was collected at 100 K on a single G_{th} -CR2 crystal to near 2.3 Å resolution.

Crystals of G_{th} in complex with CR3 domain were grown in hanging drops containing equal volumes (1 μL) of purified proteins and reservoir solution (30% PEG 400, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 200 mM CaCl_2 , 0.2% dodecylmaltoside). Crystals were observed after 1–2 days and cryo-protected directly on the cryo stream at the SOLEIL synchrotron microfocus beam line PROXIMA-2. A full data set was collected at 100 K on a single G_{th} -CR3 crystal to 3.6 Å resolution.

Structure determination and refinement. All diffraction data were integrated and reduced using XDS program package⁴⁰. The crystals of the G_{th} -CR2 complex belonged to H32 space group and those of the G_{th} -CR3 complex to the P622 space group. In both cases, the structures were determined by molecular replacement with MOLREP⁴¹ using G_{th} in its pre-fusion conformation as search model (PDB 5I2S). Initial maps were clear enough to assess the presence of the CR domain in the crystals. As crystals of G_{th} -CR2 were anisotropic, data were submitted to the STARANISO server (<http://staraniso.globalphasing.org/cgi-bin/staraniso.cgi>) to apply an anisotropy correction of the data. These corrected data were then used for the refinement of the G_{th} -CR2 structure. For both structures, the model was iteratively built using COOT⁴² and refined with AutoBUSTER⁴³ and Phenix⁴⁴. The details of the crystallographic analysis are presented in Supplementary Table 1. Structure representations were made using PyMol (PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>). Surfaces interactions were computed with the PISA server (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver).

Characterization of the binding between G and CR domains. Purified GST-CR proteins were incubated with magnetic beads coated with GSH (Eurogentec) under agitation during 20 min at 4°C . Then, the slurry was washed with the equilibration buffer at the appropriate pH (200 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl pH 8 or 50 mM MES-NaOH pH 6). Purified G_{th} or viral particles were preincubated in this same buffer for 20 min and added to the magnetic beads bound to GST-CR construction or GST alone. After 20 min of incubation under soft agitation, the slurry was washed two times with the equilibration buffer at the appropriate pH (either 8 or 6). Beads were re-suspended in the gel loading buffer and directly analyzed on a SDS PAGE.

ITC. ITC experiments were performed at 293 K using a MicroCal iTC200 apparatus (GE Healthcare) in a buffer composed of 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 and 2 mM CaCl_2 . G_{th} , at a concentration of 50 μM , was titrated by successive injections of CR domains at a concentration of 600 μM . The titration sequence included a first 1 μL injection followed by 19 injections of 2 μL each with a spacing of 180 or 240 s between injections. OriginLab software (GE Healthcare) was used to analyze the raw data. Binding parameters were extracted from curve fitting analysis with a single-site binding model.

Binding of CR domains to cells expressing WT or mutant G. For microscopy, BSR cells were infected for 4 h and were then incubated with GST-CR2^{ATTO550} or GST-CR3^{ATTO550} at 4°C for 30 min. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with 0.5% Triton X-100. Nucleoprotein was detected by using a mouse monoclonal anti-VSV N antibody (homemade) at a dilution of 1/1000. Goat anti-mouse Alexa fluor 488 was used as secondary antibody. Images were captured using a Leica SP8 confocal microscope ($\times 63$ oil-immersion objective).

For flow cytometry experiments, HEK-293T cells were transfected with pCAGGS plasmids encoding WT or mutant G using polyethylenimine (PEI, Sigma-Aldrich). 24 h after transfection, cells were collected and incubated with a mouse-monoclonal anti-G antibody that recognizes G ectodomain (8G5F11, KeraFast) at a dilution of 1/1000. Goat anti-mouse Alexa fluor 488 (at a dilution of 1/1000) and GST-CR2^{ATTO550} (or GST-CR3^{ATTO550}) at a concentration of 0.5 μM were then simultaneously added to the cells. The fluorescence of cells was determined using a BD Accuri C6 flow cytometer.

Neutralization assay. VSV-eGFP was incubated with increasing concentrations of CR domains (either alone or in fusion with GST) for 30 min. The virus-CR

domains mixtures were then used to infect BSR cells, plated on 96-well plates at 70% confluence (in the absence of CR domains the MOI of the inoculum was 1). The percentage of infected cells (eGFP-positive) was determined 4 h p.i. using a BD Accuri C6 flow cytometer.

HAP-1 cells infection. HAP-1 cells were plated at 70% confluence and incubated, or not, with 50 nM of RAP (Enzo life science) during 15 min. Cells were then infected with VSV-eGFP at an MOI of ~ 1 . RAP was maintained during all the infection time. The percentage of infected cells (GFP-positive) was determined 4 h p.i. using a BD Accuri C6 flow cytometer. Experimental MOIs were precisely determined using the equation $\text{MOI} = -\ln[p(0)]$ where $p(0)$ is the proportion of non-infected cells and compared to that of VSV-eGFP in untreated HAP-1 cells which was normalized to 1.

Pseudotypes. HEK-293T cells at 80% confluence were transfected by pCAGGS encoding WT or mutant VSV G using PEI. At 24 h after transfection, cells were infected with VSV Δ G-GFP at an MOI of 1. Two hours p.i., cells were washed to remove residual viruses from the inoculum. Cell supernatants containing the pseudotyped viral particles were collected at 16 h p.i. The infectious titers of the pseudotyped viruses were determined on non-transfected cells by counting cells expressing the GFP using a BD Accuri C6 flow cytometer at 4 h p.i. WT and mutant G incorporation in the pseudotyped particles was assessed after supernatant concentration by SDS PAGE and western blot analysis using a rabbit-polyclonal anti-VSV G (1/5000) and a rabbit-polyclonal anti-VSV M (both homemade) (1/5000) and a goat anti-rabbit DyLight 800 conjugate was used as secondary antibody. The blot image was obtained using a LI-COR Biosciences Odyssey[®]. Experimental MOIs were precisely determined using the equation $\text{MOI} = -\ln[p(0)]$ where $p(0)$ is the proportion of non-infected cells and compared to that of VSV Δ G-GFP pseudotyped with WT G which was normalized to 1.

Cell-cell fusion assay. Cell-cell fusion assay was performed, as previously described^{10,29} (Fig. 5c). Briefly, BSR cells plated on glass coverslips at 70% confluence were co-transfected with pCAGGS plasmids encoding WT G or mutant G, and P-GFP plasmid encoding the phosphoprotein of Rabies virus fused to GFP. After 24 h of transfection, cells were incubated with fusion buffer (DMEM-10mM MES) at various pHs (from 5.0 to 7.5) for 10 min at 37°C . Cells were then washed once and incubated with DMEM-10mM HEPES-NaOH buffered at pH 7.4, 1% BSA at 37°C for 1 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in $1\times$ PBS for 15 min. Cells nuclei were stained with DAPI and syncytia formation was analyzed with Zeiss Axiovert 200 fluorescence microscope with a $\times 10$ lens.

RT-PCR. Total RNA from HAP-1 cells was extracted using TRIzol (Invitrogen) and Direct-zol RNA Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's protocol. Primer sequences were chosen spanning an exon-exon junction and are described in Supplementary Table 2. cDNA synthesis and PCR amplification steps were performed in a single reaction using the OneTaq One-Step RT-PCR Kit (Biolabs).

Data availability. The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (accession code 5OYL and 5OY9). All other relevant data are available from the authors.

Received: 21 August 2017 Accepted: 9 February 2018

Published online: 12 March 2018

References

- Barber, G. N. VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* **24**, 7710–7719 (2005).
- Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D. & Barber, G. N. Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *J. Virol.* **76**, 895–904 (2002).
- Hastie, E., Cataldi, M., Marriott, I. & Grdzlishvili, V. Z. Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* **176**, 16–32 (2013).
- Albertini, A. A. V., Baquero, E., Ferlin, A. & Gaudin, Y. Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry. *Viruses* **4**, 117–139 (2012).
- Cureton, D. K., Massol, R. H., Saffarian, S., Kirchhausen, T. L. & Whelan, S. P. Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS Pathog.* **5**, e1000394 (2009).
- Johannsdottir, H. K., Mancini, R., Kartenbeck, J., Amato, L. & Helenius, A. Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J. Virol.* **83**, 440–453 (2009).
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F. A. & Gaudin, Y. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **313**, 187–191 (2006).

8. Roche, S., Rey, F. A., Gaudin, Y. & Bressanelli, S. Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein g. *Science* **315**, 843–848 (2007).
9. Baquero, E. et al. Intermediate conformations during viral fusion glycoprotein structural transition. *Curr. Opin. Virol.* **3**, 143–150 (2013).
10. Baquero, E. et al. Structural intermediates in the fusion-associated transition of vesiculovirus glycoprotein. *EMBO J.* **36**, 679–692 (2017).
11. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–267 (1996).
12. Cronin, J., Zhang, X. Y. & Reiser, J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* **5**, 387–398 (2005).
13. Matrai, J., Chuah, M. K. & VandenDriessche, T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol. Ther.* **18**, 477–490 (2010).
14. Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S. & Rubinstein, M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 7306–7311 (2013).
15. Amirache, F. et al. Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* **123**, 1422–1424 (2014).
16. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34–47 (1986).
17. Rudenko, G. et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* **298**, 2353–2358 (2002).
18. Beglova, N. & Blacklow, S. C. The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 309–317 (2005).
19. Lo Surdo, P. et al. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* **12**, 1300–1305 (2011).
20. Hussain, M. M. Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family. *Front. Biosci.* **6**, D417–D428 (2001).
21. Rodenburg, K. W. & Van der Horst, D. J. Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. *Biochim. Biophys. Acta* **1736**, 10–29 (2005).
22. Albertini, A. A. et al. Characterization of monomeric intermediates during VSV glycoprotein structural transition. *PLoS Pathog.* **8**, e1002556 (2012).
23. Willnow, T. E. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J. Mol. Med.* **77**, 306–315 (1999).
24. Willnow, T. E. Receptor-associated protein (RAP): a specialized chaperone for endocytic receptors. *Biol. Chem.* **379**, 1025–1031 (1998).
25. Bu, G. & Marzolo, M. P. Role of rap in the biogenesis of lipoprotein receptors. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 148–155 (2000).
26. Prasad, J. M., Migliorini, M., Galisteo, R. & Strickland, D. K. Generation of a potent low density lipoprotein receptor-related Protein 1 (LRP1) antagonist by engineering a stable form of the receptor-associated protein (RAP) D3 domain. *J. Biol. Chem.* **290**, 17262–17268 (2015).
27. Matsuura, Y. et al. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* **286**, 263–275 (2001).
28. Tani, H. et al. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.* **81**, 8601–8612 (2007).
29. Ferlin, A., Raux, H., Baquero, E., Lepault, J. & Gaudin, Y. Characterization of pH-sensitive molecular switches that trigger the structural transition of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the postfusion state toward the prefusion state. *J. Virol.* **88**, 13396–13409 (2014).
30. Fisher, C., Beglova, N. & Blacklow, S. C. Structure of an LDLR-RAP complex reveals a general mode for ligand recognition by lipoprotein receptors. *Mol. Cell* **22**, 277–283 (2006).
31. Beglov, D. et al. Structural insights into recognition of beta2-glycoprotein I by the lipoprotein receptors. *Proteins* **77**, 940–949 (2009).
32. Wu, Q. Type II transmembrane serine proteases. *Curr. Top. Dev. Biol.* **54**, 167–206 (2003).
33. Hofer, F. et al. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 1839–1842 (1994).
34. Albecka, A. et al. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* **55**, 998–1007 (2012).
35. Yamamoto, S. et al. Lipoprotein receptors redundantly participate in entry of hepatitis C virus. *PLoS Pathog.* **12**, e1005610 (2016).
36. Verdager, N., Fita, I., Reithmayer, M., Moser, R. & Blaas, D. X-ray structure of a minor group human rhinovirus bound to a fragment of its cellular receptor protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 429–434 (2004).
37. Ammayappan, A., Peng, K. W. & Russell, S. J. Characteristics of oncolytic vesicular stomatitis virus displaying tumor-targeting ligands. *J. Virol.* **87**, 13543–13555 (2013).
38. Rose, N. F., Roberts, A., Buonocore, L. & Rose, J. K. Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **74**, 10903–10910 (2000).
39. Harper, S. & Speicher, D. W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol. Biol.* **681**, 259–280 (2011).
40. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
41. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25 (2010).
42. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
43. Bricogne, G. et al. BUSTER version X.Y.Z. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd. (2016).
44. Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DEQ20120323711) and by grants from ANR (ANR 11 BSV8 002 01 and ANR CE11 MOBARHE) to Y.G. We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) and synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France) for provision of radiation facilities. Access to crystallization platform was supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05. This work has benefited from the expertise of the Macromolecular Interactions Measurements Platform of I2BC. We particularly thank Magali Aumont for the technical assistance and Michel Desmadril for his expertise in ITC. We also thank Danielle Blondel, Abbas Abou-Hamdan and Cécile Lagaudrière-Gesbert for careful reading of the manuscript.

Author contributions

J.N. designed, performed and analyzed cellular virology experiments; L.B. purified and characterized the proteins, grew the crystals, participated in diffraction data collection, in data processing and in the structure determination, and performed and analyzed cellular virology experiments; P.L. participated in diffraction data collection, in data processing and in the structure determination and refined the structure; H.R. performed cell–cell fusion assays. Y.G. supervised the work, designed the experiments, analyzed all the data and wrote the manuscript; A.A. designed and performed the experiments, analyzed all the data and wrote the manuscript.


Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03432-4>.

Competing interests: The mutants described in this work are the subject of a patent application by CNRS on which J.N., L.B., H.R., A.A. and Y.G. are named as inventors. P.L. declares no competing interests.

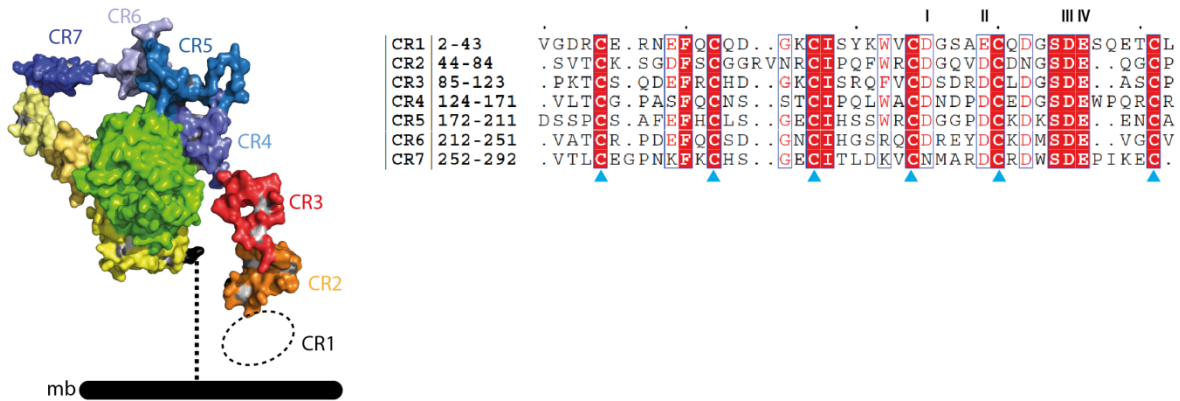
Reprints and permission information is available online at <http://ngp.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

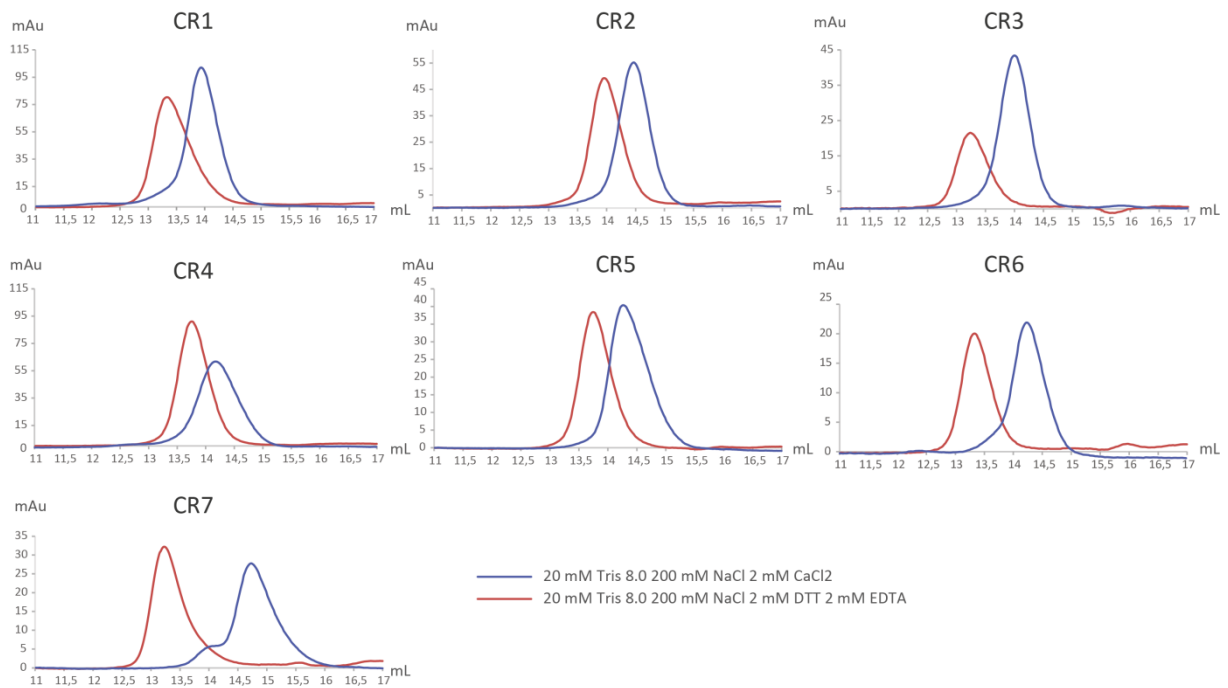
© The Author(s) 2018

Supplementary Information



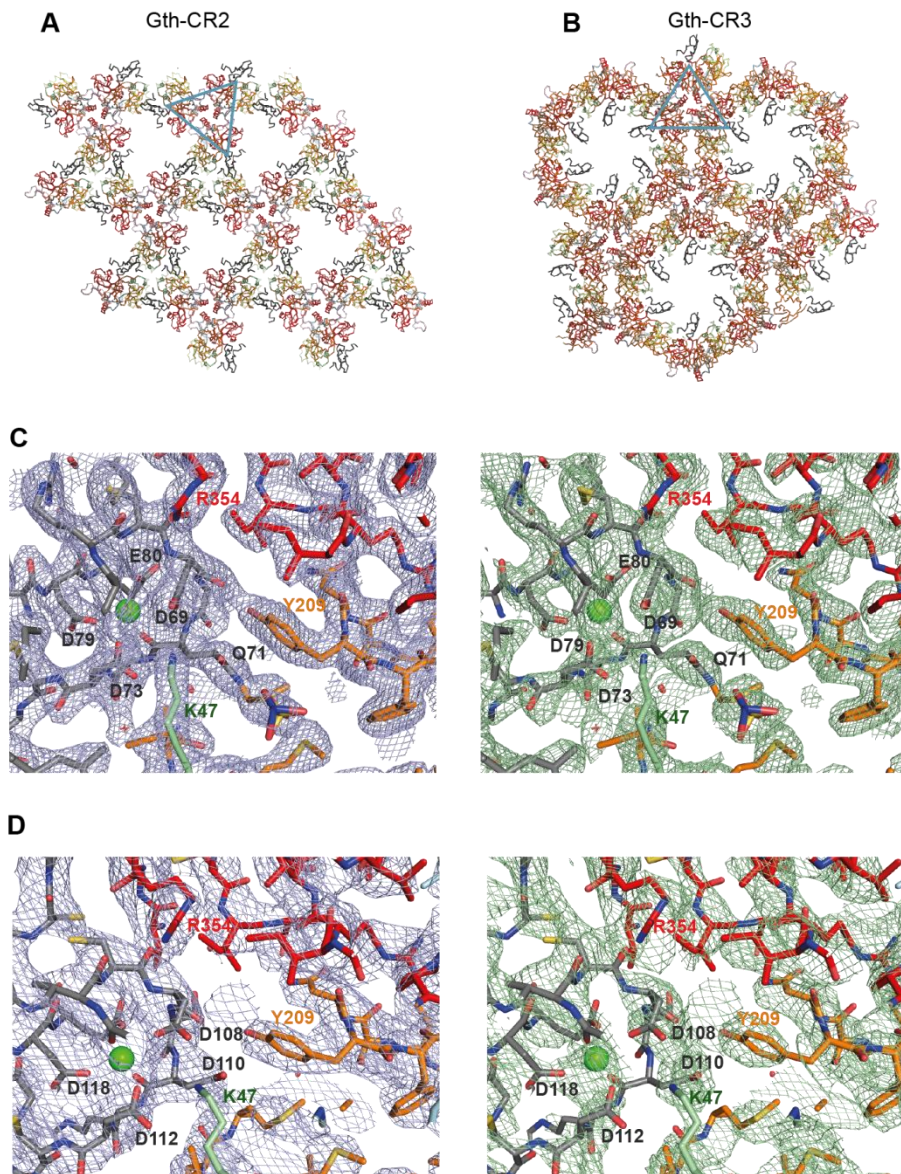
Supplementary Figure 1 (related to the introduction):

Crystal structure of the LDL-R ectodomain (from CR2 to the EGF domain) in its closed conformation at acidic pH¹ and sequence alignment of the CR repeats of the human LDL-R. Acidic residues involved in the Ca²⁺ cage are labelled with I II III and IV, conserved cysteine residues engaged in disulfide bonds are marked by a blue triangle. Conserved residues are in red boxes and similar residues are shown by red letters boxed in blue.



Supplementary Figure 2 (Related to figure 1 and 2):

Gel filtration elution profile of purified CR domains on a S75 Superdex HR10/30. Elution profiles of refolded CR domains are in blue and of CR domains after denaturation by 2 mM EDTA and 2 mM DTT are in red. Refolded CR domains eluted at 14.25 +/- 0.25 ml and denatured CR domains eluted at 13.5 +/- 0.25 ml.



Supplementary Figure 3 (Related to figure 3 and 4):

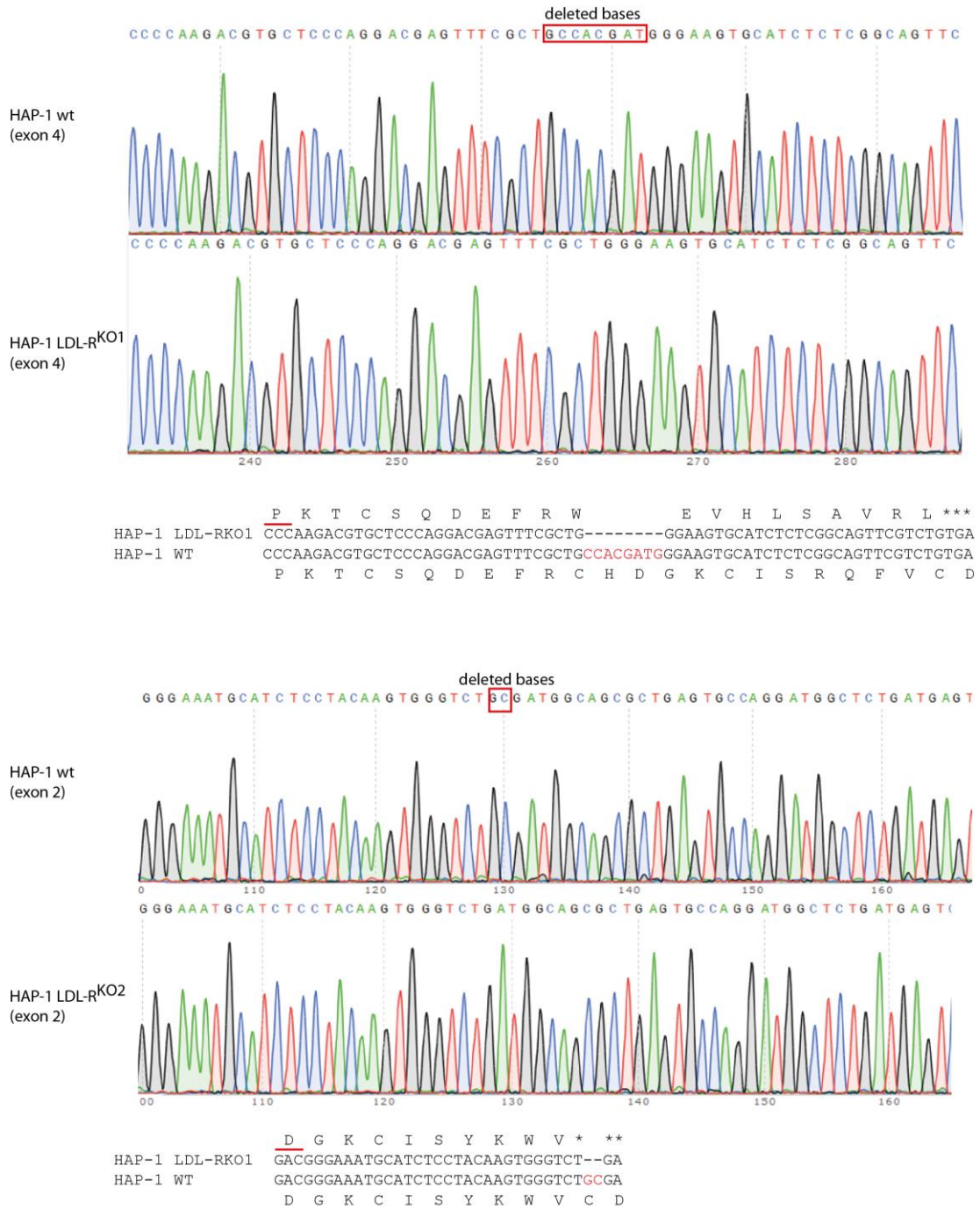
A Crystal lattice of G_{th}-CR2 crystals belonging to the space group *H32*.

B Crystal lattice of G_{th}-CR3 crystals belonging to the space group *P622*.

G is colored by domains and CR are in black. In **A** and **B**, the blue triangle indicates a G a pre-fusion trimer.

C-D Interaction area of both G_{th}-CR2 (**C**) and G_{th}-CR3 (**D**) models represented in sticks and accompanying electron density maps. Key residues discussed in the text are indicated. CR

domains are in grey and G is depicted by domains. The final refined $2F_o-F_c$ map (in blue) and omit map (in green) are both contoured at 1σ . Omit map to validate the agreement between the atomic model and X-ray data was calculated using SFCHECK².



Supplementary Figure 4:

Nucleotide sequence of the regions flanking the deletion in the LDL-R gene in HAP-1 LDL-R^{KO1} and HAP-1 LDL-R^{KO2} cell lines. The protein sequence is indicated above the nucleotide sequence. The deleted nucleotides are in red. The first stop codon following the deletion is indicated by three stars.

Supplementary Table 1: Data collection and refinement statistics

	Crystal G _{th} CR2 (pdb code 5OYL)	Crystal G _{th} CR3 (pdb code 5OY9)
Data collection		
Space group	H32	P622
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	90.04 90.04 515.78	90.00 90.00 120.00
α , β , γ (°)	90.00 90.00 120.00	122.35 122.35 197.81
	49.68-2.24 (2.30-2.24)	46.70-3.60 (3.73-3.6)
Resolution (Å) ^a		
<i>R</i> _{merge}	0.184 (3.861)	0.278 (5.096)
<i>R</i> _{meas}	0.203 (4.242)	0.298 (5.469)
<i>R</i> _{pim}	0.084 (1.741)	0.106 (1.957)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	8.7 (1.61)	9.2 (1.32)
<i>CC</i> _{1/2}	0.998 (0.494)	0.998 (0.222)
Completeness (%)	99.9 (98.3)	99.8 (98.1)
Redundancy	11.1 (10.9)	13.8 (13.7)
Refinement		
Resolution (Å)	29.98 - 2.25	44.85 - 3.6
No. Reflections	29837	10727
<i>R</i> _{work}	0.190	0.236
<i>R</i> _{free}	0.219	0.268
No. atoms		
Macromolecules	3567	3525
Ligand/ion	96	56
Water	149	
<i>B</i> -factors		
Macromolecules	53.32	156.42
Ligand/ion ^b	82.93	179.35
Solvent	45.96	116.86
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.007	0.006
Bond angles (°)	0.98	0.83

^aThe values in parentheses are for the highest-resolution shell.

^bLigand/ion includes a Ca atom in the acidic cluster of both CR domains.

Supplementary Table 2: primers used for RT-PCR experiments

mRNA	Primers	Expected size
vLDLR	ACATGAAATCAGCTGTGGCG AGTCTGCATCATCGTCGCAT	308
LRP1	GAACCCATCCTACGTGCCTC CAGTCATTGTCATTGTCGCATCT	474
LRP2	GTGCAGACCTAAAGGAGCGT ACAACAGCGCAGCCAATTTC	300
LRP3	AACCAGAAAAGCTGTCCCGA GGTCTCGAAGGCCCTGTATT	291
LRP4	GTGCAGTGAGTGCTCTTGGA CGCATGTCACACTGCTCATC	337
LRP5	GTCGTCCGGTGACAGAGTTACA TCTCGAGGGAGATCCTGTGG	384
LRP6	ATTATTGTCCCCCGATGGGC TAACCACTGCCTGCCGATTT	383
LRP8	GACGACGACTGTGGTGACG TGGTTGCAGTGCTTGATTGC	395
SORL1	CAACTGCGAAAACCCACAG TACACGTCTTCGGTTGGTGG	383

Supplementary Reference

1. Rudenko, G. et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* **298**, 2353-8 (2002).
2. Vaguine, A. A., Richelle, J. & Wodak, S. J. SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 191–205 (1999).



1.3. Conclusion

Dans cette étude nous avons montré que les domaines CR2 et CR3 du LDLR (mais pas les autres CR) produits de façon recombinante, lient VSV G avec des affinités similaires. Nous avons également montré qu'ils neutralisent l'infection virale lorsqu'ils sont présents dans l'inoculum viral avant infection, avec la même efficacité.

Les structures de Gth en complexe avec CR2 et en complexe avec CR3 ont été résolues. L'analyse des structures montre que le site d'interaction des deux CR est le même sur Gth dans chaque structure. Le site d'interaction sur G est essentiellement constitué de deux résidus du domaine de trimérisation : H8 et R354, d'un résidu du domaine d'homologie à la pleckstrine : Y209, et de deux résidus de la région charnière R2 : K47 et A51. Cette surface d'interaction est éclatée lors du changement de conformation de G provoqué par l'abaissement du pH, ce qui explique l'incapacité des domaines CR à se lier à G sous sa forme post-fusion.

Parmi ces résidus, K47 et R354 sont indispensables à l'interaction, en effet lorsque ces résidus sont remplacés soit par une alanine soit par une glutamine, la glycoprotéine mutante ne lie plus les domaines CR. De plus, lorsque ces G mutantes sont exprimées transitoirement à la surface de cellules, elles conservent leur capacité à induire la formation de syncytia lors de l'abaissement du pH. Cela signifie que pour VSV G l'activité de fusion et l'activité de liaison au récepteur peuvent être découplées.

Le rôle d'autres membres de la famille du LDLR, en tant que récepteurs alternatifs du VSV a été étudié. Nous avons utilisé la protéine associée au récepteur (RAP), un ligand commun à tous les membres de la famille du LDLR qui bloque la liaison au ligand de tous les membres de la famille des LDLR à l'exception du LDLR lui-même (Bu et Marzolo, 2000; Finkelshtein et al., 2013).

Il a été démontré que RAP inhibe significativement l'infection par VSV dans des lignées cellulaires HAP déficientes pour l'expression du LDLR (HAP LDLR^{K0}), mais pas dans celles exprimant le LDLR (HAP WT). Nous avons ensuite mis en évidence dans les HAP LDLR^{K0} les ARN messagers d'autres membres de la famille du LDLR comme LRP1, LRP3, LRP4, LRP6, la sortiline (SorLA), et le vLDLR (Figure 6C de l'article). Ainsi lorsque le LDLR n'est pas présent, VSV peut utiliser un ou plusieurs de ces récepteurs alternatifs, qui possèdent aussi des domaines CR, pour infecter les cellules.

Enfin, les G mutantes affectées dans la liaison des CR ont été utilisés pour pseudotyper un VSV recombinant (VSVΔG-GFP) dans laquelle le gène codant pour G a été remplacé par le gène codant pour la GFP. Ces pseudotypes ne sont pas infectieux bien que les G mutantes soient incorporées dans l'enveloppe des virions aussi efficacement que la G WT, et que leur l'activité de fusion ne soit pas affectée. La perte d'infectivité des pseudotypes portant une G mutante est donc due à leur incapacité à reconnaître un récepteur cellulaire. Ceci a été observé dans différentes lignées cellulaires de mammifère (HEK, BSR, CHO) et de drosophile (S2). Ceci suggère fortement que les seuls récepteurs de VSV, y compris dans les cellules d'insectes, appartiennent à la famille du LDLR ou à d'autres protéines transmembranaires contenant des domaines CR similaires. Par conséquent, VSV G a spécifiquement évolué pour interagir avec les domaines CR des membres de la famille des LDLR.

Le fait qu'il soit possible de découpler l'activité de fusion de l'activité de liaison au récepteur ouvre la voie à la possibilité de recibler VSV G vers des récepteurs d'intérêt, ce qui serait un avancement majeur en virothérapie oncolytique, ce point sera abordé dans la partie discussion.

2. Caractérisation structurale de la glycoprotéine de VSV en complexe avec un anticorps neutralisant

2.1. Contexte

L'immunité humorale est l'un des moteurs principaux de l'évolution des glycoprotéines virales. Pour les virus enveloppés, les glycoprotéines sont les seules protéines externes du virus, et sont la cible des anticorps. A l'heure actuelle aucune structure de glycoprotéine de Rhabdovirus en complexe avec un anticorps n'est connue. De telles informations peuvent fournir des indices utiles en termes d'évolution et de fonction.

L'anticorps monoclonal 8G5F11 a été isolé et caractérisé au laboratoire de D. Lyles (Lefrancois and Lyles, 1982b) avant sa commercialisation sous forme d'anticorps purifiés ou d'hybridome qui le sécrète. Il est dirigé contre l'ectodomaine de VSV G et neutralise plusieurs génotypes du genre Vésiculovirus (Munis et al., 2018)(Figure 32).

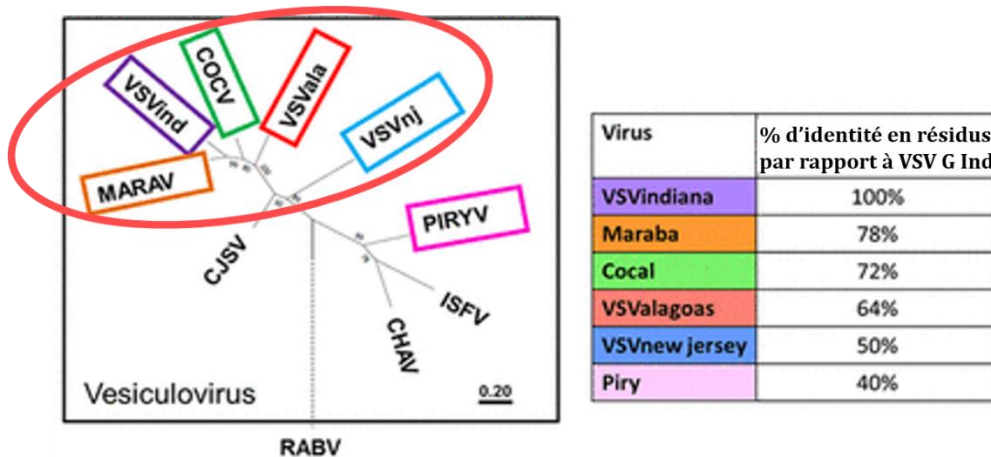


Figure 32. Arbre phylogénétique des Vésiculovirus.

Les génotypes encadrés de différentes couleurs sont ceux qui ont été testés dans (Munis et al., 2018). Les génotypes neutralisés par l'anticorps 8G5F11 sont entourés en rouge. Le pourcentage d'identité de séquence en acides aminés par rapport à VSV G Indiana est répertorié dans le tableau.

2.2. Objectifs

L'objectif de cette partie de ma thèse est de caractériser l'interaction entre VSV G et le Fab 8G5F11 et d'obtenir des informations structurales sur ce complexe VSV G-Fab 8G5F11.

2.3. Résultats

2.3.1. Neutralisation de l'infection virale par le Fab

Pour savoir si les Fab de l'anticorps 8G5F11 neutralisent l'infection virale par le VSV, nous avons incubé le virus avec différentes concentrations de Fab. Cet inoculum est ensuite utilisé pour infecter des cellules à une multiplicité d'infection (MOI) égale à 1. Le virus utilisé pour cette expérience est un virus recombinant codant pour la eGFP (enhanced green fluorescent protein). Ceci permet de distinguer les cellules infectées (qui expriment la eGFP) des cellules non infectées.

Les expériences de neutralisation ont été effectuées sur des cellules BSR et le pourcentage de cellules infectées a été mesuré par cytométrie en flux (Figure 33).

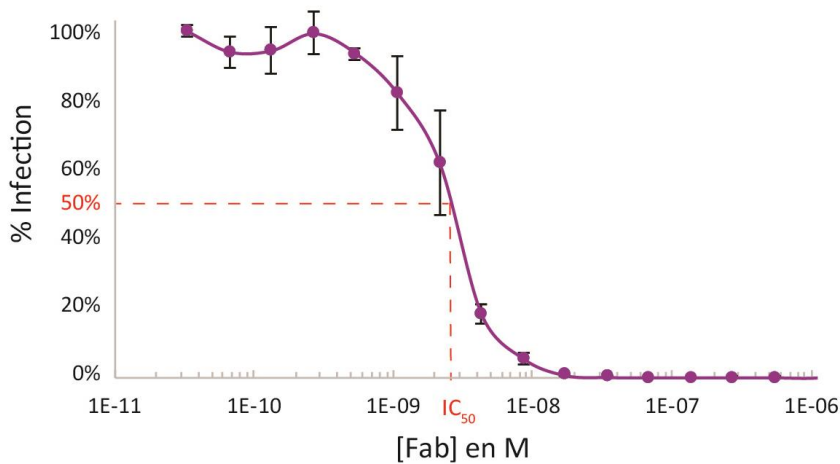


Figure 33. Courbe de neutralisation de l'infection de VSV par les Fab.

Courbe représentant le pourcentage de cellules infectées en fonction de la concentration en Fab. Les traits pointillés rouges permettent d'approximer l'IC₅₀ de la concentration en Fab nécessaire pour la neutralisation du VSV.

Les Fab 8G5F11 neutralisent VSV avec une IC₅₀ de l'ordre du nM (Figure 33).

2.3.2. Etude de l'interaction entre VSV G et le Fab

Les domaines accessibles sur G sont différents suivant la conformation adoptée par cette dernière. Afin de savoir quelles sont les conformations de G reconnues par l'anticorps 8G5F11 nous avons réalisé des tests d'interaction entre des Fab et l'ectodomaine soluble ou G à la surface du virus purifié.

2.3.2.a. Interaction entre G_{th} et le Fab 8G5F11

Pour savoir quelles conformations de G_{th} sont reconnues par le Fab 8G5F11, nous avons pré-incubé séparément et à différents pH les anticorps avec de la protéine A couplée à de la résine sépharose, et G_{th} mélangé à de la BSA (qui sert ici de témoin négatif d'interaction). Les anticorps liés par la protéine A couplée à la résine, sont incubés aux différents pH avec le mélange G_{th}/BSA. Si G_{th} est reconnue par l'anticorps, elle sera retenue sur les billes. Après lavage aux mêmes pH, les billes sont analysées sur SDS-PAGE en condition non réductrices (Figure 34 A).

Pour tous les pH testés (de pH 5,5 à pH 8), G_{th} a été retenue sur les billes par la protéine A (Figure 34 A). L'anticorps 8G5F11 reconnaît donc G_{th} à pH 8 et à pH 6 c'est-à-dire sous ses conformations pré- et post-fusion.

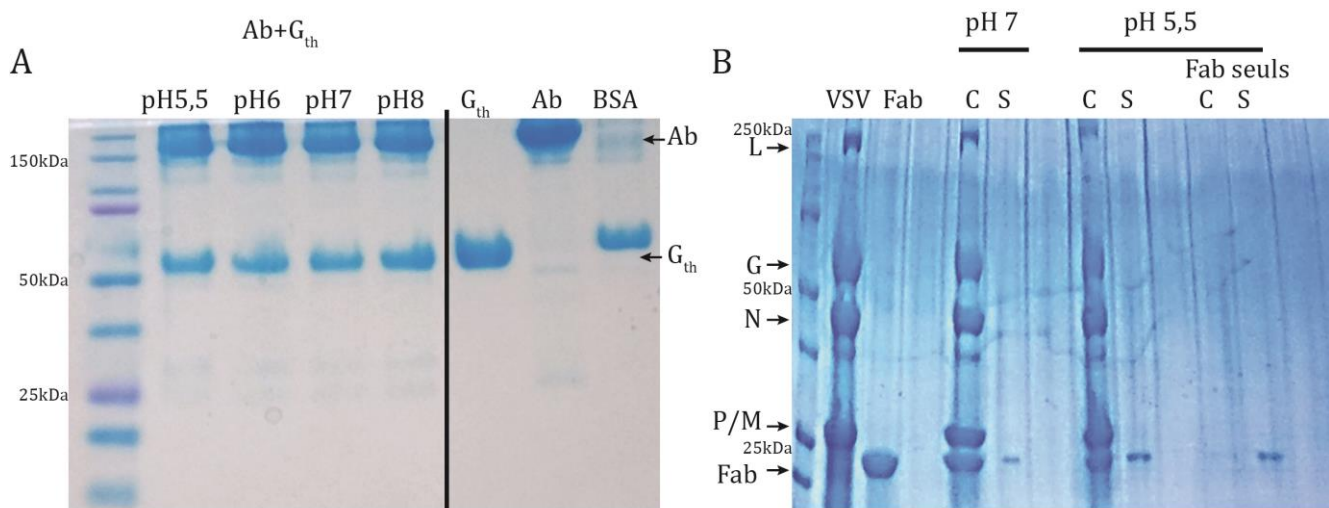


Figure 34. Interaction des Fab avec G_{th} en solution (A) et à la surface des particules virales (B).

A. SDS-PAGE en condition non réductrice. A gauche du gel sont déposés les échantillons retenus sur les billes de protéine A. A droite du gel sont déposées séparément les différentes protéines. L'anticorps en condition non réductrice migre à un poids moléculaire apparent de 150kDa et G_{th} à 55kDa. **B.** SDS PAGE des culots et surnageants après ultracentrifugation. Lorsque les Fab interagissent avec les particules virales, ils sont retrouvés dans culot. Les Fab en conditions réductrices migrent avec un poids moléculaire apparent de 25 kDa et G_{th} de 55kDa.

2.3.2.b. Interaction entre VSV G et le Fab 8G5F11, à la surface des particules virales

Pour savoir si G est également reconnue sous ces deux conformations à la surface des particules virales, nous avons pré-incubé séparément à pH 7 ou à pH 5,5, le virus et les Fab purifiés pendant 1h avant de les mettre en contact et de déposer le mélange sur un coussin de glycérol pour ultracentrifugation. Si le Fab lie le virus, il sera entraîné au culot avec les particules virales au travers du coussin de glycérol.

La fraction supérieure et le culot sont récupérés puis analysés par SDS-PAGE en conditions réductrices (Figure 34 B). Le Fab se trouve dans le culot à pH 7 et à pH 5,5 lorsqu'il a été incubé avec le virus alors que ce n'est pas le cas dans le contrôle lorsqu'il est centrifugé seul (Figure 34 B). Cette expérience montre donc que le Fab 8G5F11 reconnaît G à la surface des particules virales à pH 7 et 5,5, c'est-à-dire que G soit sous sa conformation pré- ou post-fusion à la surface virale.

Nous avons voulu voir si la fixation de ces Fab avait un impact sur l'organisation des G à la surface des particules virales. Pour cela, nous avons observé les particules virales seules et associées aux Fab par microscopie électronique après coloration négative (Figure 35).

A pH 8, il est possible d'observer quelques rares trimères de G sous conformation pré-fusion (Figure 35 A); A haut pH, G est en effet majoritairement monomérique. L'épaisseur de la couche de G est comprise entre 8 et 9 nm ce qui correspond à une population de monomères avec une conformation proches de celle du protomère pré-fusion (Albertini et al., 2012; Libersou et al., 2010) (Figure 35 A,C).

En présence de Fab, G semble moins flexible et donc plus visibles à la surface des particules virales. L'épaisseur de la couche G/Fab dans ces conditions mesure alors 10 à 13 nm (Figure 35 A,C). A pH 6 les G présentes à la surface des particules virales sont toutes sous forme de

trimères post-fusion (Albertini et al., 2012) et recouvrent entièrement la particule virale. L'ectodomaine de G dans ces conditions mesure entre 11 et 12 nm (Figure 35 B).

Lorsque les Fab lient G, ceci semble perturber l'organisation de G à la surface du virus. La couche G/Fab mesure alors entre 11 et 14 nm. Il est possible que la variation de cette épaisseur dépende de l'orientation du complexe G-Fab par rapport à la membrane du virus. A pH 6 on ne distingue plus de trimère post-fusion de G (vus de dessus), seuls les Fab sont visibles. Ceci semble indiquer que les Fab recouvrent totalement la particule virale et se lient à un domaine de G exposé lorsque G est sous cette conformation (Figure 35 C).

2.3.3. Isolation et caractérisation du complexe G/Fab

Quelle que soit l'approche structurale utilisée (microscopie électronique ou cristallographie), l'obtention d'un échantillon pur et homogène est indispensable.

L'ectodomaine de VSV G est constituée de 446 acides aminés (Figure 15). Il est possible d'isoler une majeure partie de l'ectodomaine de VSV G à partir de stocks de virus concentrés par protéolyse ménagée des particules virales en utilisant la thermolysine. Après protéolyse, G_{th} est séparée du reste des particules virales par différentes étapes de centrifugation et de chromatographie (détaillées dans le matériel et méthode). La dernière étape de purification de G_{th} est une étape de chromatographie d'exclusion de taille dont le profil d'élution est présenté (Figure 36).

L'hybridome 8G5F11 sécrète l'anticorps d'intérêt dans les surnageants de culture. Pour produire une grosse quantité d'anticorps, les hybridomes sont cultivés à haute densité cellulaire dans un bioréacteur. Après récolte des surnageants de culture, une étape de chromatographie d'affinité sur résine d'agarose couplée à la protéine A permet d'isoler les anticorps. Les anticorps purifiés sont ensuite digérés par la papaïne immobilisée sur résine. Le produit de digestion par la papaïne contient les 2 Fab (fragment antigen binding) et le FC (fragment that crystallizes). Le passage du produit de digestion sur protéine A permet de récupérer les Fab tandis que les FC restent liés à la protéine A. Les Fab sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion de taille (Figure 36).

Le complexe est formé en incubant G_{th} et les Fab (en excès) à pH 8. Le complexe est ensuite purifié par chromatographie d'exclusion de taille. Les volumes d'élution de G_{th} et du complexe G_{th} -Fab sont identiques (Figure 36 A,C). En effet, G_{th} interagit avec la matrice de la colonne (probablement *via* ses boucles de fusion hydrophobes) ce qui lui confère un volume d'élution (22 ml sur une Superdex Increase 200 10/300) en dehors de la zone de fractionnement de la colonne (Figure 36).

Les quantités isolées permettent d'envisager une étude structurale par une approche de cristallisation.

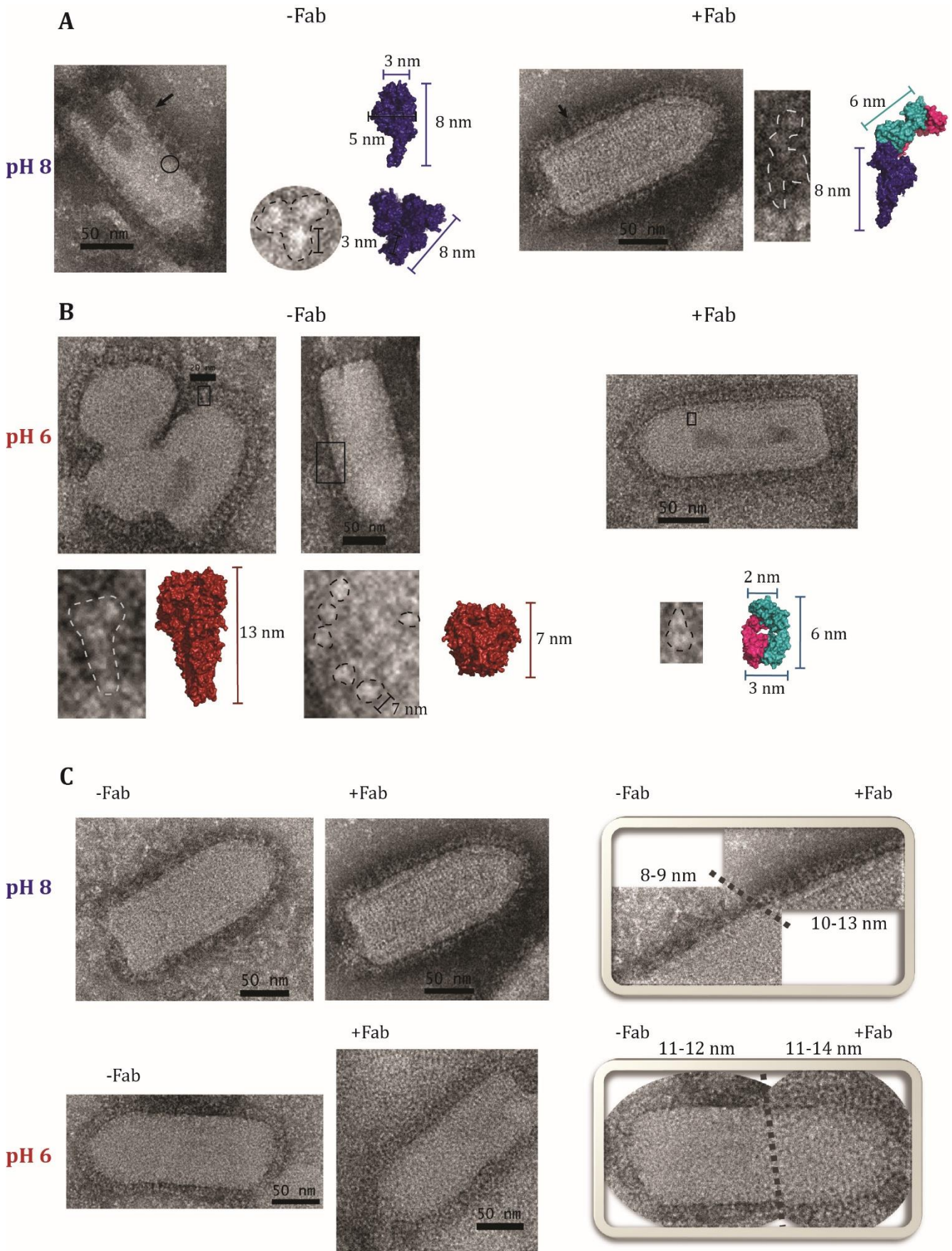


Figure 35. Morphologie de G à la surface des particules virales à pH 8 et à pH 6, en absence et en présence des Fab 8G5F11. (Suite de la légende page ci-contre).

2.3.4. Etude structurales du complexe G_{th}-Fab

Dans un premier temps, nous avons utilisé une approche par cristallographie aux rayons X pour obtenir des données structurales à haute résolution sur le complexe G_{th}-Fab. G_{th} est une protéine stable et robuste qui a déjà cristallisé dans de nombreuses conditions. En effet, plusieurs structures de G_{th} sous plusieurs conformations, seule ou en complexe avec des domaines de son récepteur ont déjà été obtenues (Nikolic et al., 2018; Roche, 2006; Roche et al., 2007). Aussi, si l'approche cristallographique n'est pas fructueuse le complexe G_{th}-Fab peut constituer un objet adéquat pour la cryo-microscopie électronique (cryo-EM) comme cela a déjà été le cas c'est pour la glycoprotéine MERS-CoV S et SARS-CoV S chez le coronavirus (Walls et al., 2019).

2.3.4.a. Cristallisation du complexe G_{th}-Fab

Après purification (vu dans la partie précédente), le complexe G_{th}-Fab a été soumis à plusieurs cribles de cristallisation sur la plateforme de cristallisation. Différentes conditions de cristallisation ont ainsi été identifiées (Figure 37 A,C). Les formes cristallines les plus prometteuses poussent dans 0,3 M Na/K Tartrate et dans 12% PEG 8000, 0,2M ammonium sulfate, 0,1M Tris-HCl pH 8,5. Afin de vérifier que ces cristaux contenaient bien les deux protéines, un de ces cristal a été déposé sur gel (Figure 37 B).

Pour la cristallisation du complexe G_{th}-Fab, différentes stratégies ont été utilisées :

- (i) Des variations dans les conditions de cristallisation,
- (ii) Différentes concentrations du complexe,
- (iii) L'ajout de détergent de type maltoside (qui a tendance à favoriser la cristallisation de G_{th} en présence de PEG de petite taille (Baquero et al., 2015b, Albertini et Gaudin, données non publiées),
- (iv) L'utilisation de différentes formes de G_{th} (notamment un mutant) et d'un ectodomaine plus long exprimé en cellules S2,
- (v) L'emploi de la technique de micro- et macro ensemencement de cristaux.

Malheureusement, aucun des cristaux du complexe G-Fab obtenus jusque présent n'a permis l'obtention d'informations structurales. En effet, Les cristaux diffractent peu, et la diffraction s'arrête de manière nette à basse résolution (entre 18Å et 8Å).

(Suite de la légende de la Figure 35). A. Particules virales de VSV incubées à pH 8 en absence et en présence des Fab 8G5F11 (Les flèches noires, sur les particules virales indiquent des monomère pré-fusion de G et G-Fab 8G5F11, et le cercle indique un trimères pré-fusion de G. Une vue rapprochée ainsi qu'un modèle en représentation de surface de la structure cristallographique de G et G-Fab 8G5F11 de ces éléments sont représentés. La structure cristallographique du Fab utilisée est celle de l'anticorps neutralisant du VIH D5 (PDB : 2CMR). Le Fab a été positionnée sur G de façon arbitraire. B. Particules virales de VSV incubées à pH 6 en absence et en présence des Fab 8G5F11. En absence de Fab, un trimère post-fusion vu de côté ainsi qu'une zone montrant plusieurs trimères vus de dessus, sont encadrés sur les particules virales. En dessous, leur vue rapprochée et les modèles en surface correspondants sont représentés. En présence de Fab, les trimères post-fusion de G à la surface des particules sont difficilement distinguables. En revanche à quelques endroits on aperçoit distinctement un Fab en surface, l'un est encadré sur le virus, et en bas sa vue rapprochée et son modèle en surface sont présentés.

C. Morphologie de G à la surface des particules virales en présence et en absence des Fab 8G5F11 à pH 8 (en haut) et à pH 6 (en bas). Les encarts sur la droite montrent de façon juxtaposée l'aspect des G ancrées dans la membrane virale en absence ou en présence des Fab.

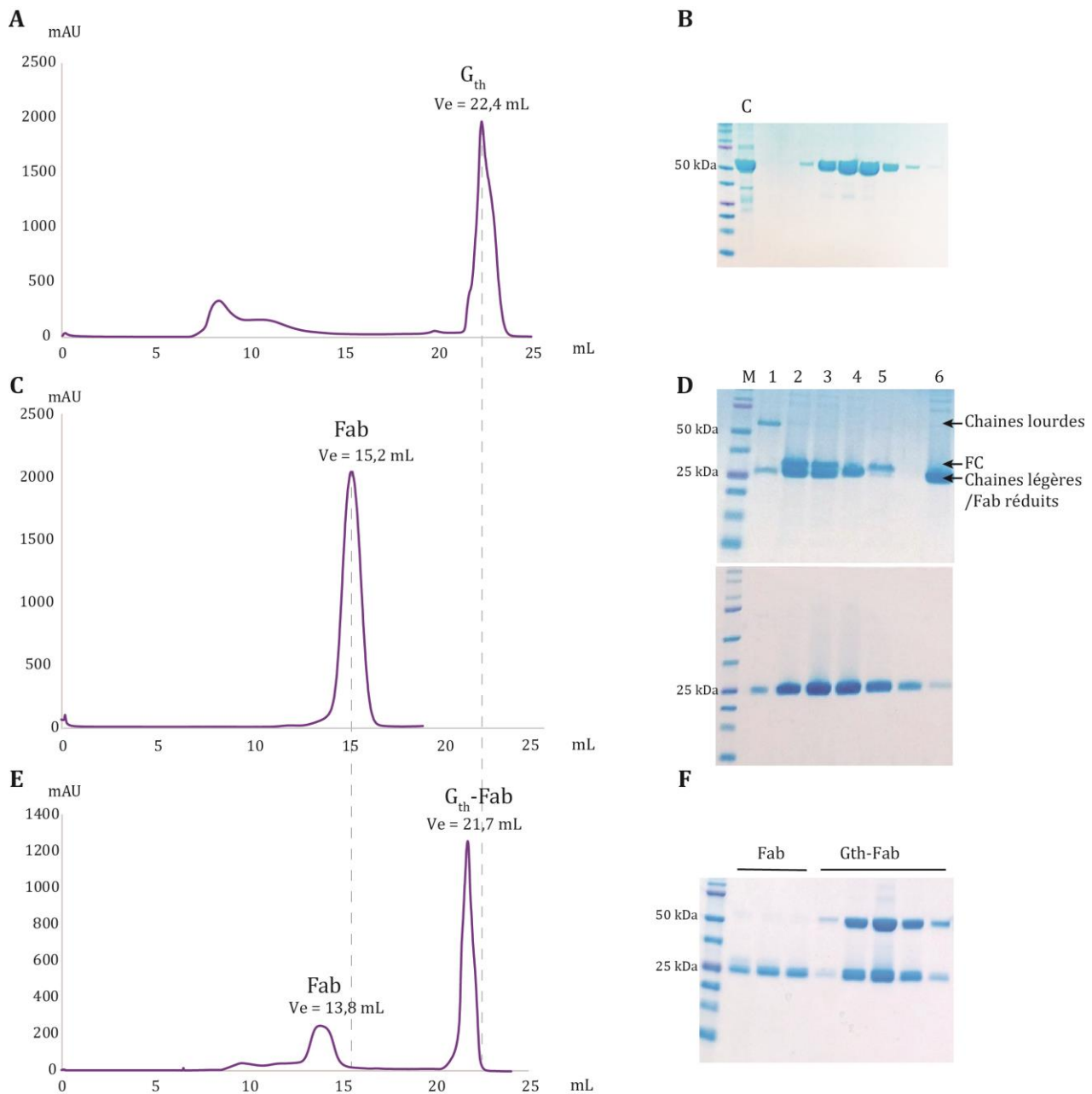


Figure 36. Purification de G_{th} , des Fab 8G5F11 et du complexe G_{th} /Fab 8G5F11

Purification de G_{th} (A-B). A. Profil d'élution de G_{th} après injection sur colonne Superdex 200 Increase 10/300, GE Healthcare). B. SDS-PAGE correspondant à la fraction injectée (C) puis aux fractions d'élution de l'étape de chromatographie d'exclusion de taille. Purification des Fab (C-D). C. Profil d'élution des Fab 8G5F11 après injection sur colonne Superdex 200 Increase 10/300). D. Le SDS-PAGE du haut correspond aux étapes de production et préparation des Fab à partir des anticorps. 1 : Anticorps purifiés, 2 : Anticorps digérés par la papaine, 3 : Chargement sur protéine A, après avoir retiré la papaine immobilisée, 4 : Fraction non retenue sur la protéine A, contenant les Fab, 5 : Fragments FC après lavage à pH acide, 6 : Fraction de chargement sur la Superdex 200 Increase 10/300 après concentration. Le SDS-PAGE du bas correspond aux fractions d'élution de l'étape de chromatographie d'exclusion de taille. Purification du complexe G_{th} -Fab (E-F). E. Profil d'élution du complexe G_{th} -Fab après injection sur Superdex 200 10/300. F. SDS-PAGE des fractions d'élution de l'étape de chromatographie d'exclusion de taille.

Néanmoins, la majorité des conditions de cristallisation ayant donné des cristaux sont tamponnées à un pH de 8,5 (Figure 37 C). Ceci nous amène à penser que le complexe présent dans le cristal pourrait contenir la G sous sa forme pré-fusion.

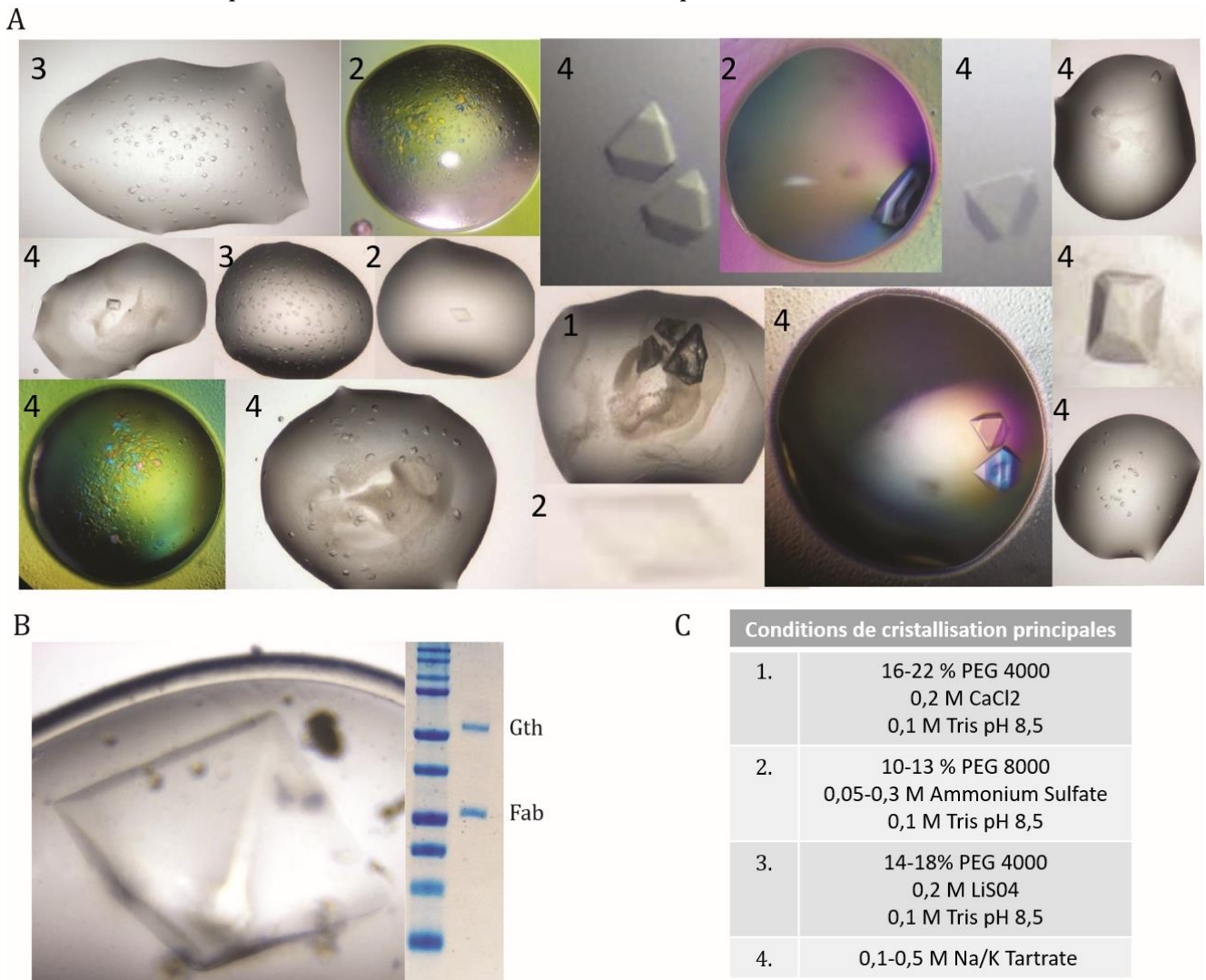


Figure 37. Galerie des cristaux du complexe G_{th}-Fab.

A. Cristaux G Fab obtenus dans différentes conditions. Le chiffre sur les images indique la condition auxquelles les cristaux ont été obtenus. **B.** Cristal déposé sur gel dénaturant. **C.** Conditions de cristallisation optimisées.

2.3.4.b. Etude du complexe G_{th}-Fab par microscopie électronique

Afin de visualiser le complexe G_{th}-Fab par microscopie électronique nous avons formé le complexe directement sur les grilles de microscopie. Pour cela G_{th} est adsorbée en premier sur la grille de carbone et ensuite les Fab sont ajoutés directement sur cette même grille. Des observations de G_{th} seule et des Fab ont été également réalisées aux mêmes pHs. Le colorant utilisé pour la coloration est le NaPT à pH 7,5 ou l'acétate d'uranyle (AU) à pH 5,5.

Les Fab gardent la même morphologie à pH 8 et pH 6. Ils mesurent 6 nm et sont constitués de deux domaines globulaires. Ces dimensions sont en accord avec celles attendues pour un Fab (Figure 38).

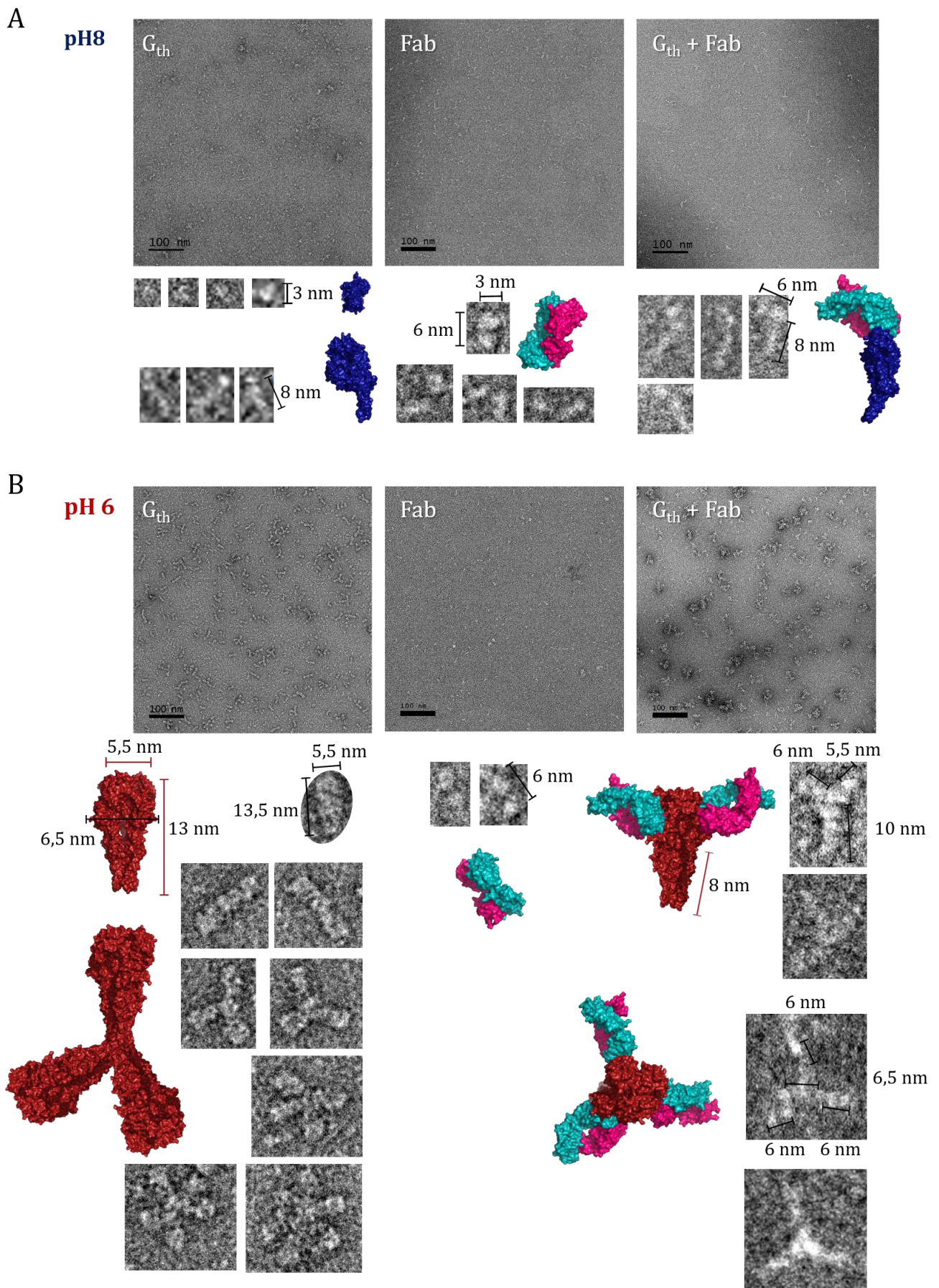


Figure 38. Morphologie de G_{th} en solution à pH 8 et à pH 6, en absence et en présence des Fab 8G5F11, visualisés par microscopie électronique en coloration négative. (Légende ci-contre)

A pH 8, G_{th} est monomérique; les objets visibles sont de petite taille (3 nm de large pour une longueur de 8-9 nm). A pH 6, G est trimérique avec une forme caractéristique de « massue » mesurant 12 nm de long et 6 nm de large (Figure 38 A) (Albertini et al., 2012; Libersou et al., 2010).

Sur les complexes G_{th} -Fab formés à pH 8, il est possible de distinguer des monomères de G_{th} sous forme pré-fusion associés aux Fab (Figure 38 A).

A pH 6, chaque trimère de G_{th} sous forme post-fusion est associé à 3 Fab. Ceci est particulièrement visible lorsque G_{th} est orientée perpendiculairement à la grille; sur ces « vues de dessus » les 3 Fab fixés sont clairement visibles tandis que sur des orientations latérales seuls deux Fab sur le trimère sont distinguables (Figure 38 B).

Les observations en coloration négative permettent de confirmer que G_{th} interagit avec le Fab 8G5F11 et de visualiser cette interaction. Il a ainsi été possible de préciser la stœchiométrie du complexe G_{th} -Fab : un Fab par monomère pré-fusion de G et trois Fab par trimère post-fusion de G . Dans le trimère post-fusion, la fixation d'un Fab sur un protomère ne semble pas interférer avec la fixation des autres Fab sur les deux autres protomères constitutifs.

2.3.4.c. Etude du complexe G_{th} -Fab par cryo-EM

Aujourd'hui la cryo-EM ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la biologie structurale. Le principe est de congeler très rapidement l'échantillon sous forme hydratée de façon à figer les protéines dans leur état natif en solution. L'absence de colorant permet à la protéine de rester dans les conditions de pH et salinité, qu'on lui a attribué. La basse température permet d'augmenter la durée de vie de l'échantillon sous le faisceau d'électron. Le microscope 200kV FEG de la plateforme est équipé d'une caméra à détection directe dont la grande sensibilité permet d'enregistrer plusieurs dizaines d'images pendant des temps courts. Le recalage et l'addition de ces images conduisent à des images dont le rapport signal/bruit est élevé. Le microscope de la plateforme fournit ainsi un outil idéal pour initier ce projet et obtenir un modèle initial du complexe G_{th} -Fab à basse résolution.

Le complexe G_{th} -Fab est formé directement sur la grille. La grille est ensuite séchée avant d'être rapidement congelée. Une des limites de la cryo-EM est la taille de l'objet à observer ; c'est la raison pour laquelle nous n'avons travaillé qu'à pH 6. En effet, le complexe G_{th} -Fab dans ces conditions devrait avoisiner les 300 kDa ce qui rend le complexe observable en cryo-EM.

Les trimères de G_{th} ou de G_{th} -Fab sont bien répartis sur la grille dans plusieurs orientations. Les complexes sont homogènes et bien dispersés dans les trous des grilles ce qui encourageant pour la suite de l'étude par cryo-EM.

(Suite de la légende de la Figure 38). A. Images de microscopie électronique de G_{th} , des Fab et du complexe G_{th} -Fab, à pH 8, colorés au NaPT pH 7,5. B. Images de microscopie électronique de G_{th} , des Fab et du complexe G_{th} -Fab, à pH 6, colorés à l'AU à pH 5,5. En dessous de chacune des images sont présentées les vues rapprochées des objets représentatifs observés, ainsi qu'un modèle en représentation de surface. Les images présentées dans la figure ont été agrandies et mises en annexes pour permettre une meilleure visualisation.

Pour finir, ces images de cryo-EM ont été collectées sur la plateforme de cryo EM de l'I2BC (un FEI Technai 200kV-FEG- équipé d'une caméra à détection directe K2 Gatan). Cela nous a permis de mettre au point les conditions de préparation des grilles. Pour aller plus loin nous devrons collecter des images sur un microscope de nouvelle génération (Microscope TITAN 300kV de Thermo Scientific par exemple). Ceci devrait nous permettre d'obtenir la structure du premier complexe d'une glycoprotéine de Rhabdovirus en complexe avec un Fab neutralisant.

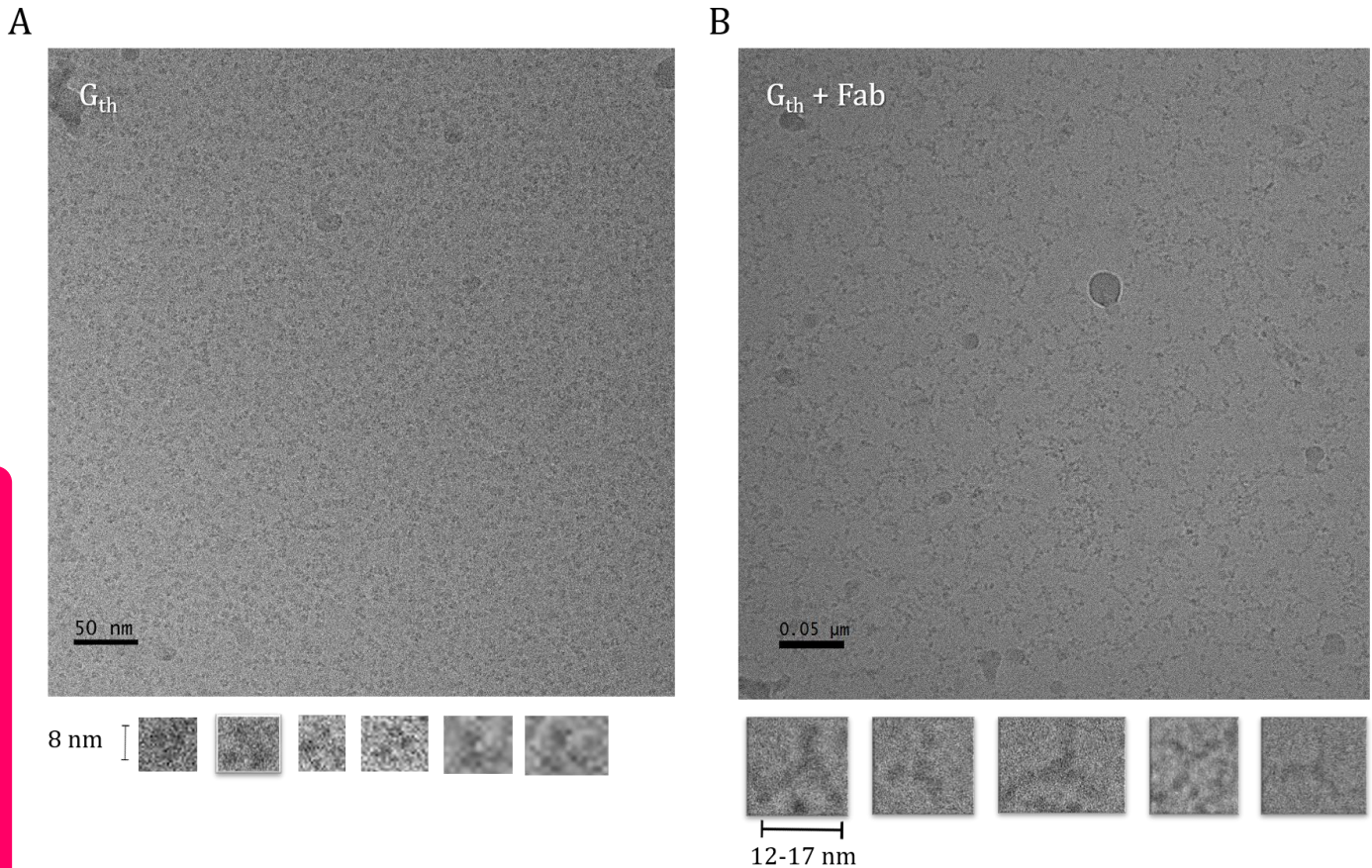


Figure 39. Observations de G_{th} à pH 6, en absence et en présence des Fab, par cryo-EM.
A. Images de cryo-EM de G_{th} à pH 6 à 1 mg/mL. **B.** Images de cryo-EM du complexe G_{th} -Fab à pH 6. En dessous de chacune des images sont présentées les vues rapprochées des objets représentatifs observés de G_{th} et G_{th} -Fab. Les images présentées dans la figure ont été agrandies et mises en annexes pour permettre une meilleure visualisation.

2.4. Conclusion

Le Fab 8G5F11 neutralise l'infection de VSV Indiana avec un IC_{50} de l'ordre du nM. Ces Fab reconnaissent à la fois la forme pré- et post-fusion de G_{th} en solution ainsi qu'à la surface des particules virales. Ceci indique que le site de fixation du Fab sur G est accessible dans les deux conformations pré- et post-fusion. Le plus vraisemblable est qu'il reconnaisse un domaine de G qui ne change pas de structure lors de la transition structurale et qui est accessible à la surface du virus dans les deux conformations pré- et post-fusion. En accord avec les images de microscopie électronique sur G_{th} dans sa conformation post-fusion associée à 3 Fab, l'épitope de l'anticorps est probablement localisé dans le TrD ou le PHD qui contient le site antigénique majeur de RABV G.

De nombreux cristaux ont été testés au synchrotron mais leur diffraction n'a jamais été suffisante pour résoudre la structure du complexe Gth-Fab. La cryo-EM devrait nous permettre d'obtenir la structure de ce complexe. Les conditions de préparation des grilles en cryo-EM ont été mises au point. Nous espérons prochainement avoir des données sur ce complexe à haute résolution, qui nous permettraient de connaître la structure du premier complexe G-Fab d'un Rhabdovirus.

3. Structure de la G des Lyssavirus

3.1. Contexte

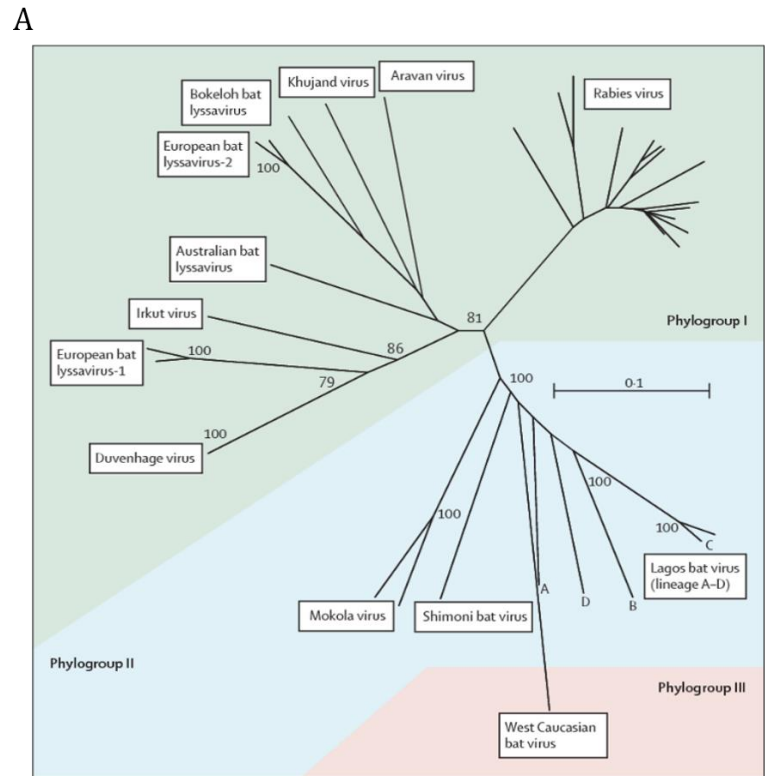
A l'heure actuelle il n'existe aucune structure de glycoprotéine de Lyssavirus. Le nombre de virus identifiés dans le genre Lyssavirus augmente régulièrement (Banyard et al., 2014; Hayman et al., 2016; Rupprecht et al., 2011; Shipley et al., 2019).

Figure 40. Arbre phylogénétiques des Lyssavirus.

A. D'après (Both et al., 2012). Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences de la nucléoprotéine de chaque génotype. Selon l'antigénicité proposé de chaque groupe d'isolat, les virus sont divisés en trois phylogroupes différents.

B. Matrice d'alignement des séquences protéiques des glycoprotéines de Lyssavirus de différents phylogroupes.

Les valeurs présentes dans le tableau correspondent au % d'identité entre les séquences.



B

	RAGV G	DUVV G	MOKV G	WCBV G
RAGV G	100	69	58	50
DUVV G	69	100	56	50
MOKV G	58	56	100	53
WCBV G	50	50	53	100

Nous nous sommes intéressés en premier à la G du virus de la rage (RABV). Nous avons utilisé pour cela la souche vaccinale pasteur (PV) adaptée à la culture cellulaire. Un des avantages de cette souche est qu'elle produit beaucoup de virus. Nous nous sommes également intéressés à d'autres Lyssavirus plus divergents comme le virus Duvenhage (DUVV) et ceux appartenant à d'autres phylogroupes comme le virus Mokola (MOKV) (phylogroupe II) et le virus de la chauve-souris ouest africaine (WCBV) (phylogroupe III) (Figure 40).

3.2. Objectifs

L'objectif de cette partie de mon travail de thèse est d'obtenir des informations structurales sur la glycoprotéine des Lyssavirus. Pour cela nous avons produits les ectodomaines de G de PV, DUVV, MOKV et WCBV de manière recombinante, afin d'avoir des quantités suffisantes pour une étude structurale. Nous avons aussi travaillé sur la forme complète de GPV (avec son domaine transmembranaire et intraviral) isolée à partir de particules virales concentrées.

3.3. Résultats

Afin d'étudier l'ectodomaine de G des Lyssavirus, nous avons débuté notre étude par celui de GPV.

3.3.1. Etude de l'ectodomaine de GPV

3.3.1.a. Obtention de l'ectodomaine soluble de GPV

Nous avons réalisé différentes constructions de l'ectodomaine de GPV. Ces constructions allant jusqu'aux résidus 425, 430 et 440, ce dernier correspondant à l'ectodomaine complet de G. Pour ces constructions, nous distinguerons la forme sauvage (wt) des formes mutées (m). En effet, les boucles de fusion des G comportent des motifs hydrophobes qui limitent leur production et/ou sécrétion. La première boucle de fusion TNFVG \underline{Y} VT \underline{T} T a été mutée en TNSHGR \underline{V} TT \underline{T} T et la seconde boucle de fusion YPDYHWLRT a été mutée en YPDGHSSRT.

A leur extrémité C-terminale, les constructions sont étiquetées par une double étiquette strep, permettant leur purification.

Pour les ectodomaines de différentes longueur, wt et mutants, des tests d'expression ont permis de montrer que GPVwt est bien moins exprimée que GPVm. Ici, nous présenterons le travail mené sur la construction GPV440m qui correspond à l'ectodomaine complet muté.

Après culture de cellules S2, induction puis concentration des surnageants de culture (dans lequel ont été sécrétées les protéines), GPV440m est purifiée par chromatographie d'affinité sur résine de streptactine puis d'exclusion de taille (Figure 41).

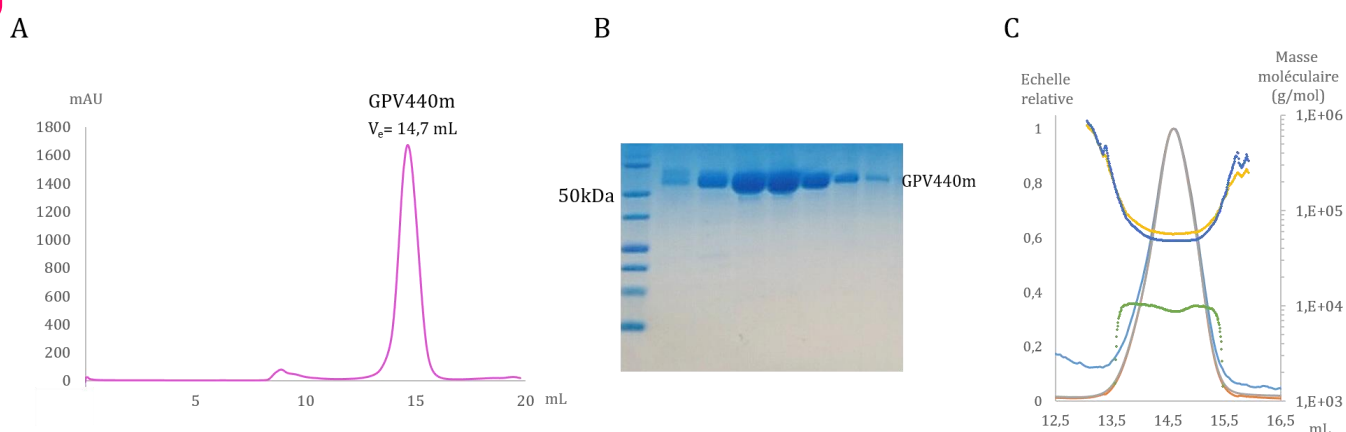


Figure 41. Purification de GPV440m.

A. Profil de chromatographie d'exclusion de taille (Superdex 200 Increase 10/300, GE Healthcare) de GPV440m. **B.** SDS-PAGE des fractions d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille. **C.** Analyse par SEC-MALS de GPV440m-strep purifiée est présentée. La courbe grise correspond au signal d'absorbance à 280nm, celle en orange correspond à la réfractométrie. Et la courbe en bleu correspond à la diffusion de la lumière. L'analyse du poids moléculaire définie par la méthode de « protein-conjugate » (cf partie Matériel et méthodes) est représentée par des points, en jaune, est indiquée la masse totale, en bleu la masse de la partie protéique et en vert la masse des glycosylations.

GPV440m est éluée à un volume de 14,7 mL sur la colonne Superdex. Le SEC-MALS indique que GPV440m-strep a une masse absolue de 56,6 kDa (47.9 ± 0.4 kDa pour la partie protéique et 8.7 ± 0.6 kDa de glycosylations obtenues comme décrit dans la partie matériel et méthodes). Ceci indique que GPV440m est monomérique en solution à pH 8 (Figure 41). A ce stade, GPV440m est purifiée en quantité suffisante pour permettre une étude structurale.

Un protocole identique permet la purification de GPV430m et GPV425m.

3.3.1.b. Etude structurale de l'ectodomaine de GPV

Les ectodomains solubles sont produits en quantité. Pour obtenir des informations structurales nous avons donc essayé de les cristalliser.

(i) Cristallogénèse de l'ectodomaine de GPV

GPV430m-streptag et GPV440m-streptag, sont les seules constructions à avoir été soumises à des cribles de cristallisation sur la plateforme de cristallographie. Seuls les cristaux de GPV440m-streptag sont montrés mais les cristaux de GPV430m-streptag étaient similaires à ceux présentés en Figure 42 A, C. Aucun ectodomaine de GPV sans son étiquette n'a pu être cristallisé pour le moment. En effet, lors des essais de clivage de cette étiquette, les ectodomains de GPV subissent une protéolyse au niveau des boucles de fusion.

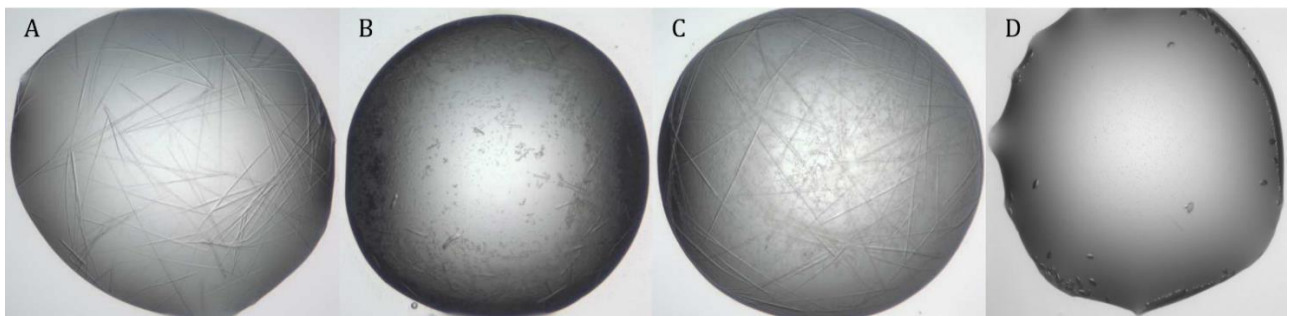


Figure 42. Galerie des cristaux de GPV440m-streptag.

Des cristaux sont formés dans différentes conditions, A. 1,5 M LiSO₄, 0,1M HEPES Na pH 7,5, B. 20% PEG 10 000, 0,1 M TRIS pH 8,5, C. 0,8 M Na/K Tartrate, 0,1 M HEPES Na pH 7,5, D. 17% PEG 550 MME, 15% Glycerol 0.085 M NaCl, 0,085 M Bicine pH 9.

Les cristaux de GPV430m-streptag et GPV440m-streptag obtenus ont été reproduits et optimisés. Nous avons testé la diffraction de ces cristaux au synchrotron SOLEIL. La diffraction étant quasi nulle nous avons abandonné ces pistes. Nous poursuivons nos essais afin d'obtenir de nouvelles conditions qui permettraient d'obtenir de nouvelles formes cristallines.

(ii) Observation par microscopie électronique de l'ectodomaine de GPV

Nous avons observé les constructions GPV425m, GPV430m, et GPV440m par coloration négative après incubation à pH 8 et à pH 6 (Figure 43).

A pH 8, les objets observés ont des dimensions compatibles avec celles attendues pour l'ectodomaine d'une glycoprotéine de Rhabdovirus sous une conformation pré-fusion. En effet, ces objets mesurent 10 nm de long en moyenne. Les GPVm, vues de haut, ont une largeur de 4 nm qui peut correspondre à la largeur de G sous forme monomérique (Figure 43).

A pH 6, les objets sont plus allongés et mesurent 14 nm de long en moyenne. Ceci est compatible avec les dimensions d'une glycoprotéine sous sa conformation post-fusion. Ces objets sont plus facilement distinguables sur les grilles indiquant qu'ils sont moins flexibles qu'à pH 8. La largeur des protéines à pH 6 est de 4 nm environ, indiquant qu'il s'agit

probablement de monomères de GPV. Aucun trimère de GPV n'est observé dans ces conditions.

Ces observations suggèrent que nos constructions sont bien capables de changer de conformations à bas pH mais, à la différence de l'ectodomaine de VSV G, elles ne semblent pas former de trimères à bas pH.

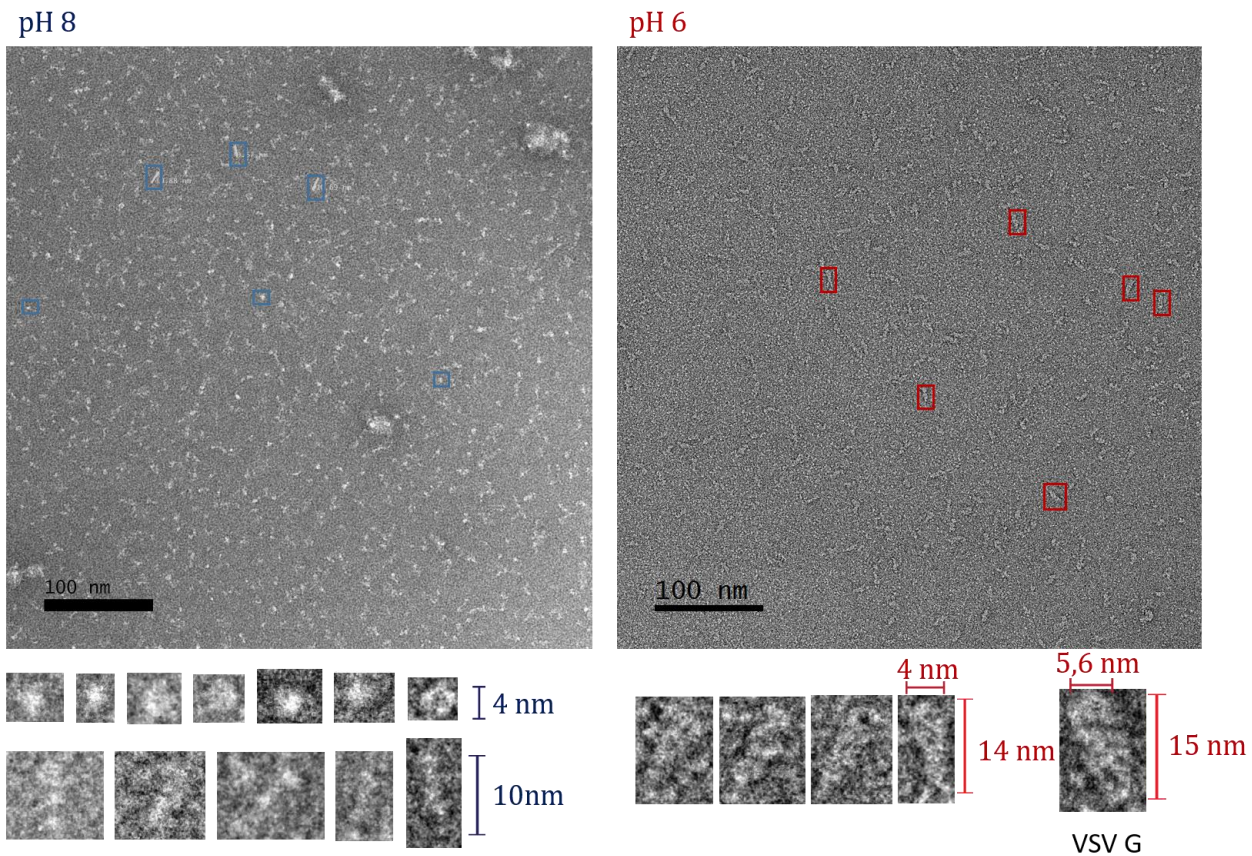


Figure 43. Morphologie de GPV440m en coloration négative à pH 8 et pH 6.

Une image de de GPV est présentée pour chacun des pH ainsi qu'une galerie d'agrandissements des objets observés sur les grilles, avec leurs dimensions indiquées. A pH 6 un agrandissement du trimère post-fusion de VSV G, à la même échelle, est montré à titre de comparaison. Les images présentées dans la figure ont été agrandies et mises en annexes pour permettre une meilleure visualisation.

3.3.2. Etude de la forme complète de GPV

3.3.2.a. Obtention de la forme entière de GPV à partir des particules virales

La forme mature de GPV (GPV_n) (c'est-à-dire avec son domaine transmembranaire et intraviral) est constituée de 505 résidus.

Pour obtenir GPV_n, les G ancrées dans la membrane virale sont solubilisées avec du CHAPS, un détergent doux qui permet de solubiliser les membranes sans dénaturer G. GPV_n est ensuite purifiée par chromatographie échangeuse d'ion, puis par chromatographie d'exclusion de taille (Figure 44). Durant la purification, le CHAPS est remplacé par le DDM qui a une concentration micellaire critique (CMC) plus basse.

Pendant l'étape de chromatographie d'exclusion de taille, GPV_n est élué à un volume d'éluion de 13,9 mL (Figure 44).

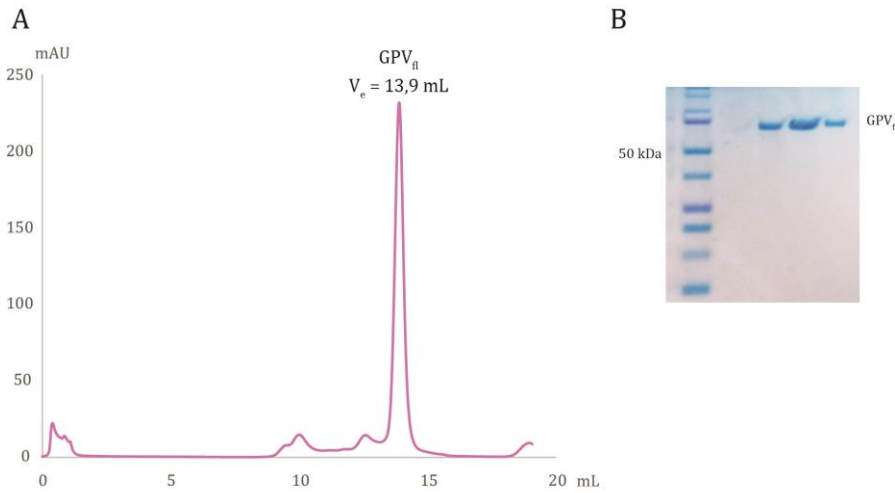


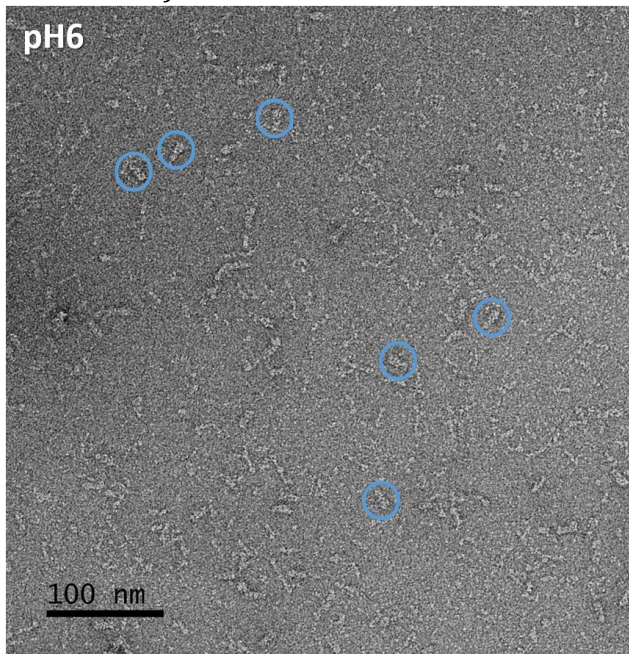
Figure 44. Purification de GPV β .
A. Profil de chromatographie d'exclusion de taille (Superdex 200 Increase 10/300) de GPV β en présence de DDM à pH 8.
B. SDS-PAGE des fractions d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille.

3.3.2.b. Etude structurale de GPV β

GPV β est une protéine qui peut cristalliser en présence de DDM et de PEG de petite taille. Ces cristaux ont déjà été étudiés et, malheureusement, ils ne diffractent pas. Nous avons donc décidé d'utiliser la microscopie électronique afin d'étudier GPV β .

(i) Observation par microscopie électronique de GPV β

Lorsque GPV β est incubée à pH 8, l'échantillon est très hétérogène (non présenté) et présente de nombreux agrégats. A pH 6, GPV β semble plus homogène (Figure 45). Les grilles montrent des objets allongés avec une forme de « massue » caractéristique des trimères post-fusion de G. Ces objets mesurent 16 nm de long et 6 nm de large. Ces dimensions sont compatibles avec celles attendues pour une forme complète de GPV (i.e. avec son domaine transmembranaire et intraviral).



A pH 6, GPV β semble donc trimérique dans la micelle de détergent. Un trimère correspond à 150 kDa et une micelle de détergent environ 50 kDa. La taille de 200 kDa des objets présent dans l'échantillon est compatible avec une étude par cryo-EM.

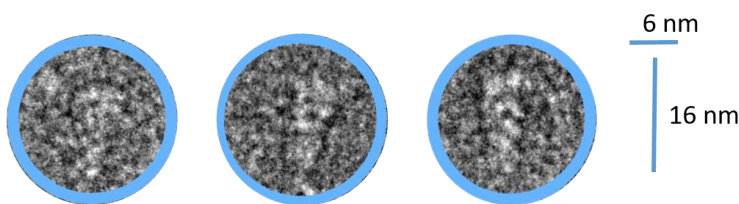


Figure 45. Morphologie de GPV β à pH 6, après coloration négative à l'acétate d'uranyle.

Des agrandissements et les mesures d'objets représentatifs sont montrés sous l'image. L'image présentée dans la figure a été agrandie et mise en annexes pour permettre une meilleure visualisation.

Nous avons donc réalisé des observations dans la glace de ce même échantillon incubé à pH 6 par cryo-EM à une concentration de 1mg/mL. Dans ces conditions, aucun trimère de GPV_{fl} n'a pu être distingué sur la grille (Figure 46 A). Les travaux de Snijder et al, ont montré que les protéines membranaires purifiées en présence de détergent n'étaient visibles sur les grilles de cryo-EM souvent qu'à des concentrations plus élevées (Snijder et al., 2017). En effet, lorsque nous avons augmenté la concentration de GPV_{fl} (à 3mg/mL), des trimères de GPV_{fl} sont visualisés (Figure 46 B).

Ces résultats sont encourageants et nous permettent d'envisager la résolution de la structure de la forme complète de GPV_{fl} par cryo-EM.

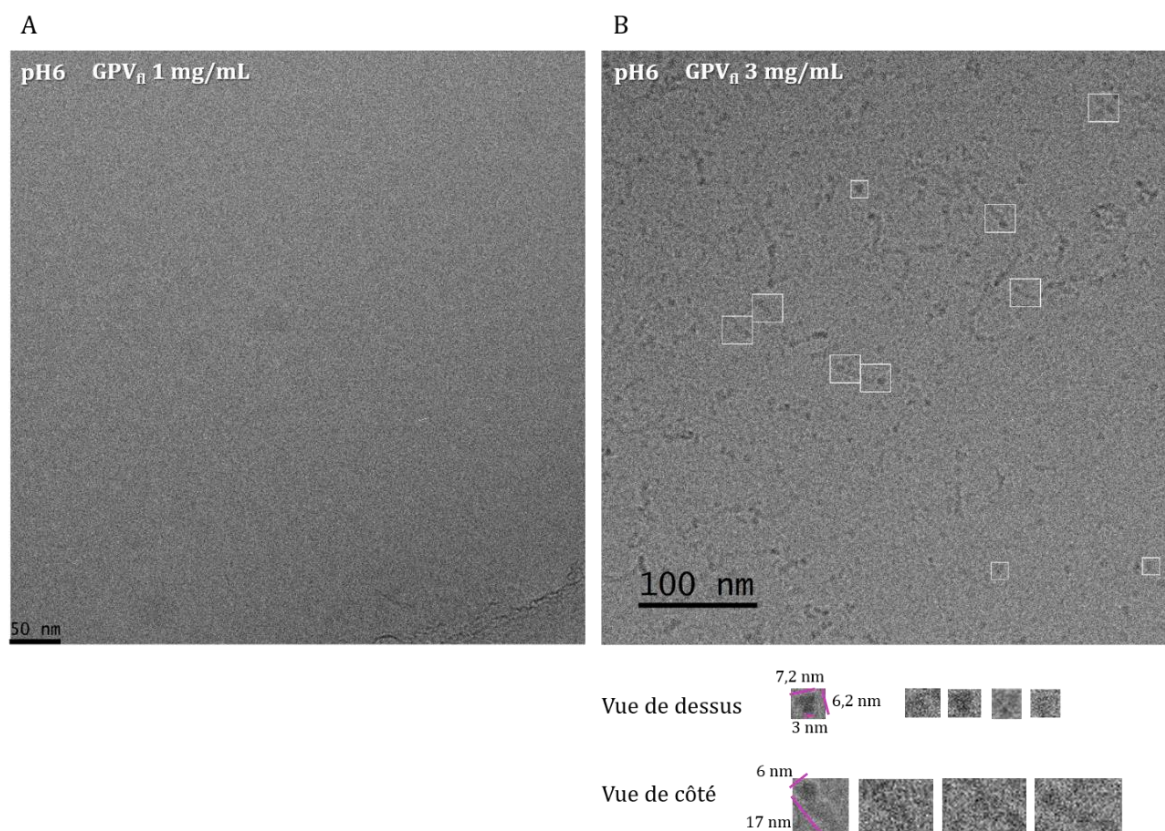


Figure 46. Images de cryo-EM de GPV_{fl} en présence de détergent à pH 6.

Images de cryo-EM de GPV_{fl} incubée à pH 6 à 1 mg/ml (A) ou à 3 mg/mL (B). Les trimères de G sont entourés d'un petit cercle pour les vues de haut et d'un grand cercle pour les vues de côté. L'image présentée en B dans la figure a été agrandie et mise en annexes pour permettre une meilleure visualisation.

3.3.3. Etude structurale de l'ectodomaine de la glycoprotéine d'autres Lyssavirus

Le genre Lyssavirus comporte de nombreux virus. Afin d'augmenter nos chances d'obtenir la structure cristallographique de la glycoprotéine d'un Lyssavirus, nous avons purifié les ectodomaines des glycoprotéines de DUVV, MOKV et WCBV. Les constructions sont basées sur le même principe que les constructions de l'ectodomaine de RABV, à savoir l'ectodomaine complet dans lequel nous avons inséré des mutations (Gm) dans les boucles de fusion ou l'ectodomaine sauvage (sans mutations).

3.3.3.a. Obtention des ectodomaines des glycoprotéines des virus MOK et WCB

Des tests d'expressions ont montrés que seules GMOK et GWCB s'exprimaient correctement dans les cellules S2. La purification de GMOKm et GWCBm est effectuée de la même manière que pour les formes solubles de GPV : une chromatographie d'affinité suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille pour les constructions avec les boucles de fusion mutées (Figure 47).

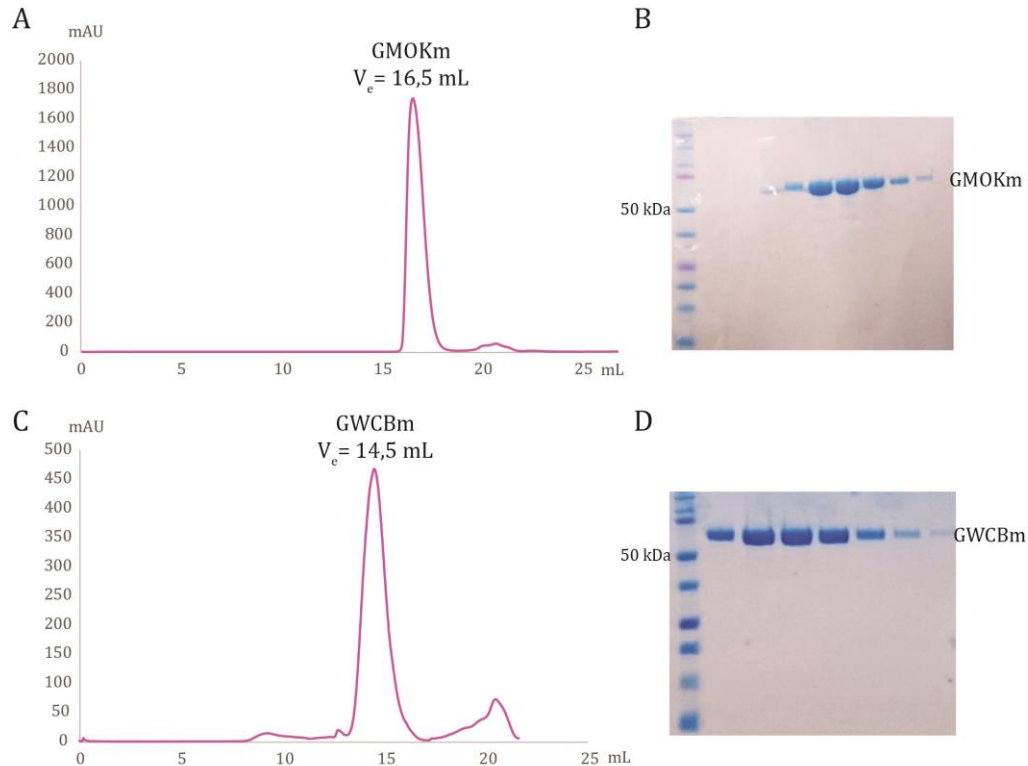


Figure 47. Purification de GMOKm et GWCBm.

A. Profil de la chromatographie d'exclusion de taille de GMOKm (Superdex 200 Increase 10/300 GE Healthcare). **B.** SDS-PAGE des fractions d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille de GMOKm. **C.** Profil de chromatographie d'exclusion de taille de GWCBm (Superdex 200 Increase 10/300 GE Healthcare). **D.** SDS-PAGE des fractions d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille de GWCBm.

GMOK sort à un volume d'élution de 16,5 mL et GWCB est élue à 14,5 mL (Figure 47). La différence entre ces volumes d'élution pourrait s'expliquer par le nombre de site potentiel de glycosylation des protéines (2 pour GMOK et 4 pour GWCB). Ces volumes d'élutions sont néanmoins proches de celui observé pour l'ectodomaine de GPV, ainsi il est fort probable que GMOK et GWCB soient monomériques en solution à pH 8.

Les quantités purifiées sont suffisantes pour permettre une étude structurale de GMOKm et GWCBm.

3.3.3.b. Etude structurale la glycoprotéine des virus MOK et WCB

La stratégie pour obtenir des informations structurales sur GMOK et GWCB est la même que pour GPV. Nous essayons de cristalliser les protéines GMOKm et GWCBm et réalisons des observations de ces ectodomaines par EM.

(i) Cristallogénèse de l'ectodomaine de GMOK

Des essais de cristallogénèse ont été effectués pour ces deux protéines (8 mg/mL pour GMOKm et 5 mg/mL pour GWCBm). GMOKm a cristallisé dans plusieurs conditions (Figure 48). Nous n'avons aucune piste de cristallisation pour GWCBm pour l'instant.

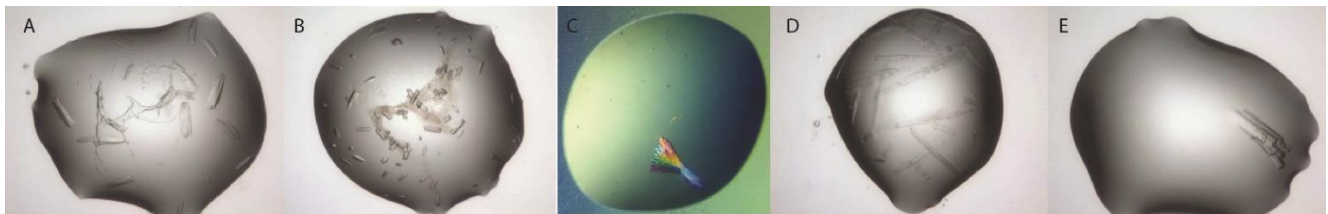


Figure 48. Galerie des cristaux de GMOKm-streptag.

Des cristaux sont formés dans différentes conditions, **A.** 20% P1500, 0,1 M HEPES pH 7,5, **B.** 20% P3350, 0,2M Na/K Tartrate, **C.** 23% P3350, 0,2M Ammonium Sulfate, 0,1 M MES pH5,5, **D.** 15% P20000, 0,1 M MES pH 6,5, **E.** 12% P4000, 0,1M Na Acétate, 0,1M HEPES pH 7,5.

Les conditions cristallines ayant permis la formation de cristaux sont majoritairement composées de PEG 3350, PEG 10 000 ou PEG 20 000. Les cristaux reproduits sont encore de petite taille mais devraient être optimisés pour être testés sur les lignes prochainement.

(ii) Etude par microscopie électronique de l'ectodomaine de GMOK

GMOKm est incubée à pH 6 de façon à induire sa transition structurale. GMOKm mesure alors 8,5 à 10 nm de long, suivant son orientation, et 3,5 nm de large (Figure 49). GMOKm semble donc monomérique à pH 6.

Lorsque les boucles de fusion de la protéine ne sont pas mutées, GMOKwt s'associe à des débris membranaires des cellules S2. Ils forment des protéoliposomes dont le diamètre est compris entre 35 et 50 nm (Figure 49). La G insérée dans la membrane de ces liposomes est trimérique.

Elle mesure 11 nm de long et 5 nm de large environ.

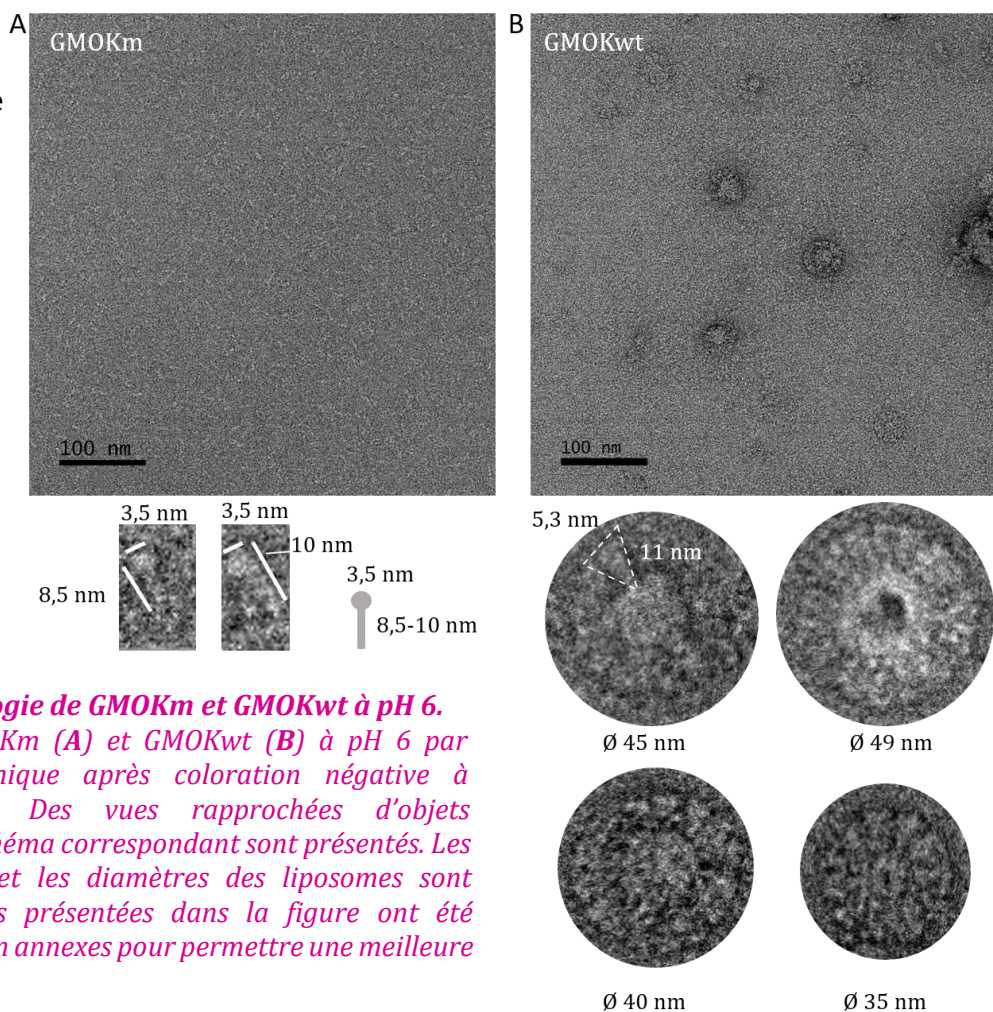


Figure 49. Morphologie de GMOKm et GMOKwt à pH 6.

Observation de GMOKm (A) et GMOKwt (B) à pH 6 par microscopie électronique après coloration négative à l'acétate d'uranyle. Des vues rapprochées d'objets représentatifs et le schéma correspondant sont présentés. Les distances mesurées et les diamètres des liposomes sont indiqués. Les images présentées dans la figure ont été agrandies et mises en annexes pour permettre une meilleure visualisation.

(iii) Etude par microscopie électronique de l'ectodomaine de GWCBm

Nous avons observé uniquement GWCBm (i.e. avec les boucles de fusion mutées) en microscopie électronique car la forme sauvage s'exprime très peu dans les cellules S2. Nous avons réalisé des observations à différents pH (Figure 50).

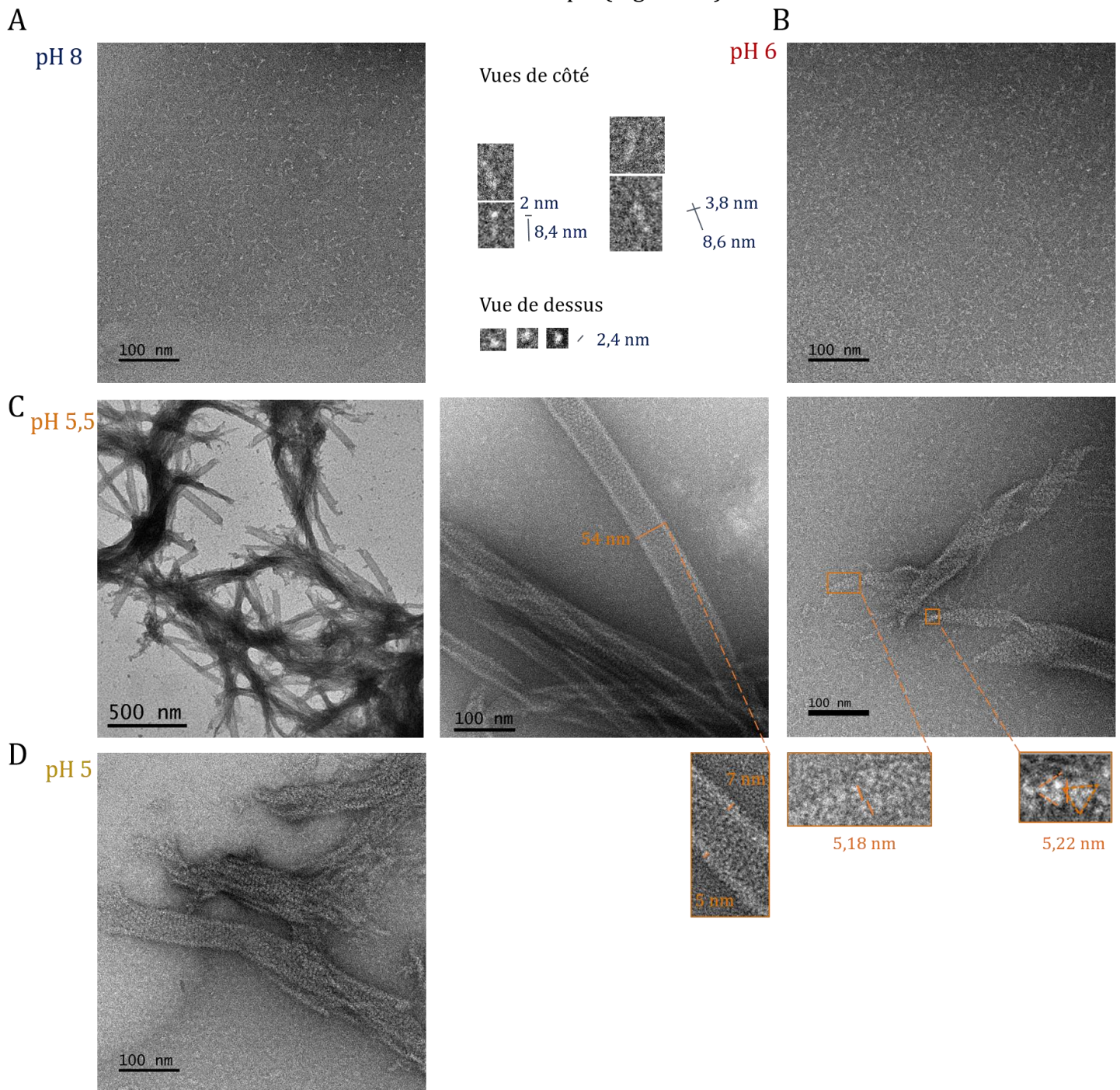


Figure 50. Morphologie de GWCBm à pH 8 et à pH 6 en microscopie électronique.

A. Morphologie de GWCBm à pH 8 après coloration négative. Des vues rapprochées de côté et de haut sont annotées des distances mesurées sur les objets de la grille. **B.** Morphologie de GWCBm à pH 6 après coloration au NaPT. **C.** Morphologie de GWCBm à pH 5,5 après coloration à l'acétate d'uranyle. Des mesures des fibres formées sont indiquées sur les images et sur les agrandissements. **D.** Morphologie de GWCBm à pH 5 après coloration à l'acétate d'uranyle. Les images présentées dans la figure ont été agrandies et mises en annexes pour permettre une meilleure visualisation.

A pH 8, nous avons pu observer de fins objets longs de 8,5-9 nm en moyenne pour une largeur de 2,5 nm (Figure 50). Ces objets semblent donc être monomériques comme le laissait présager son volume d'élution lors de l'étape de chromatographie d'exclusion de taille (Figure 47).

A pH 6, les objets sont difficiles à distinguer, ils semblent monomériques.

A pH 5,5, la grille est couverte de macro-assemblages en forme de rubans ou d'assemblages hélicoïdaux (Figure 50). Ces assemblages ont un diamètre compris entre 35 nm et 55 nm. A l'extrémité des fibres, les protéines sont plus facilement individualisables; elles s'arrangent *via* des contacts latéraux entre des trimères (Figure 50).

A pH 5, On observe des structures très semblables à celles trouvées à pH 5,5.

3.4. Conclusion

Cette partie visait à obtenir des informations structurales sur les glycoprotéines des Lyssavirus pour lesquels aucune structure tridimensionnelle n'est encore connue.

GPV, GMOKV, GWCBV se comportent toutes de la même façon à pH 8. Elles sont monomériques à pH 8 comme c'est le cas pour VSV G.

Contrairement à VSV G ; G PV, G MOKV, G WCBV semblent monomériques aussi à pH 6 tout en adoptant une forme plus allongée. Néanmoins, GMOKwt semble former des trimères lorsqu'elle est insérée dans des vésicules.

Par ailleurs GWCBV a un comportement singulier à pH inférieur à 6. En effet GWCBV s'assemble en formant des tubes sur lesquels G semble respecter une symétrie hélicoïdale. L'étude de ces tubes par cryo-EM devrait nous permettre d'accéder à la forme post-fusion de GWCBV par reconstruction hélicoïdale.

DISCUSSION

1. Bases moléculaires de l'interaction entre VSV G et son récepteur

1.1. Les récepteurs du VSV

Ce travail a permis de mettre en évidence les bases moléculaires de l'interaction entre VSV G et son récepteur principal le LDLR. De cette étude, nous avons pu conclure que VSV G a spécifiquement évolué pour interagir avec les domaines CR des membres de la famille du LDLR. La nature omniprésente de cette famille de récepteurs aussi bien chez les mammifères que chez les insectes, explique le pantropisme du VSV. Cela explique aussi pourquoi les lentivirus pseudotypés par VSV G ne permettent pas un transfert de gène efficace dans cellules T non stimulées, cellules B et cellules souches hématopoïétiques, car ces types cellulaires ont un très faible niveau d'expression de LDLR à leur surface (Amirache et al., 2014).

Par ailleurs, il avait déjà été démontré que la protéine chaperon gp96 présente dans le réticulum endoplasmique est essentielle pour l'infection par le VSV (Bloor et al., 2010). En effet, VSV G ne peut pas se lier aux cellules déficientes en gp96 ou avec une gp96 inactive. Il a donc été proposé que gp96 soit essentielle pour permettre l'arrivée de récepteurs fonctionnels de VSV à la surface des cellules (Bloor et al., 2010). Il a ensuite été démontré que les cellules déficientes en gp96 présentaient une diminution de l'expression de quatre membres de la famille des LDLR (le LDLR, LRP6, Sorl1 et LRP8) à la surface cellulaire (Weekes et al., 2012). Ces données sont en accord avec le rôle de cette famille de récepteurs dans l'entrée du VSV.

Les membres de la famille du LDLR participent à l'entrée de plusieurs autres virus appartenant à différentes familles. Parmi eux, certains rhinovirus humains (HRV) (Hofer et al., 1994) et le virus de l'hépatite C (Albecka et al., 2012; Yamamoto et al., 2016). La structure cristalline d'un complexe entre un domaine CR du vLDLR (récepteur de lipoprotéines de très basse densité) et le HRV2 révèlent que le site de fixation du virus implique une lysine conservée pointant vers la cage de calcium (Verdaguer et al., 2004). De la même manière que VSV G, la chaîne latérale de cette lysine établit des interactions hydrophobes avec un résidu tryptophane du domaine CR. Ce tryptophane chez le vLDLR correspond au W66 sur CR2 et F105 sur CR3 du LDLR (Figure. 4d, e de l'article et Figure 51). Par conséquent, les bases moléculaires de la reconnaissance du domaine CR par la protéine VP1 de HRV2 et celles de VSV G sont très similaires. De plus, comme pour VSV, dans le cas de HRV2, la structure cristalline et les données expérimentales indiquent que différents domaines CR et différents membres de la famille du LDLR sont susceptibles de jouer le rôle de récepteurs de HRV2 (Hofer et al., 1994; Verdaguer et al., 2004).

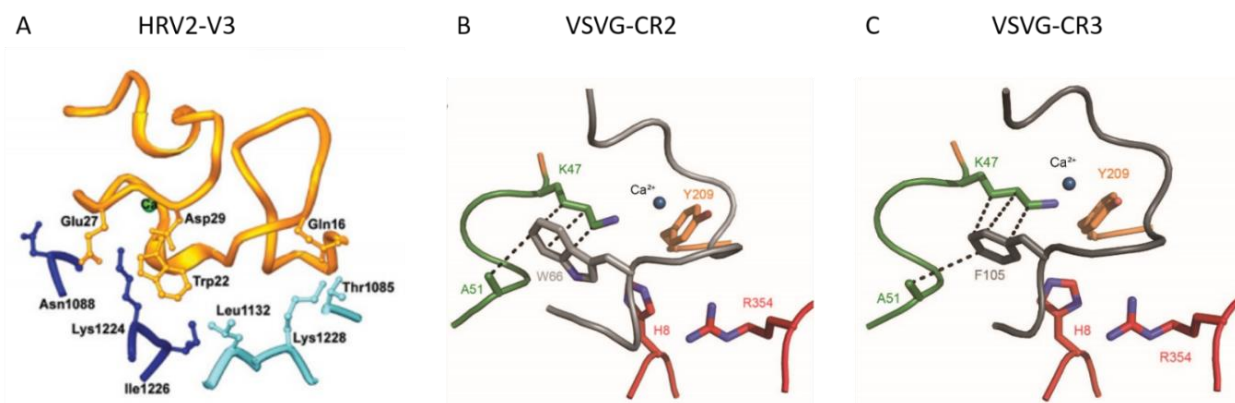


Figure 51. Interaction HRV2VP1-V3, VSV G-CR2 et VSV G-CR3.

A. Diagramme en ruban des interactions HRV2-V3, d'après Verdaguer et al., 2004 et Nikolic et al., 2018. Le CR du vLDLR est en jaune; les VP1 de HRV2 sont en bleus. Les chaînes latérales impliquées dans l'interaction sont représentées en bâton. L'ion calcium est représentée par une sphère verte. **B-C.** Interaction hydrophobes entre VSV G et CR2 (**B**) et VSV G et CR3 (**C**) du LDLR. Le CR est en gris et les résidus de G sont colorés selon le domaine auxquels ils appartiennent : H8 et R354 appartiennent au TrD, Y209 au PHD et K47 et A51 à la région charnière R2. L'ion Ca^{2+} est représentée par une sphère bleue.

1.2. 1.2. VSV G, un outil en biotechnologie

VSV G est largement utilisé pour pseudotyper les lentivirus (Mátrai et al., 2010; Naldini et al., 1996). VSV est également un virus oncolytique prometteur pour le traitement du cancer (Bishnoi et al., 2018; Durham et al., 2017; Hastie et al., 2013). Cependant le large tropisme de VSV est un inconvénient pour son utilisation en oncothérapie.

Dans ce projet, nous avons vu que les mutants de G affectés dans la liaison du domaine CR (mutants K47A, K47Q, R354A et R354Q) sont incorporés dans l'enveloppe des pseudoparticules aussi efficacement que la G sauvage et que leur activité de fusion n'est pas affectée. En revanche les pseudotypes recombinants avec ces G mutantes ne sont pas infectieux. Cette perte d'infectivité est due à leur incapacité à reconnaître leurs récepteurs cellulaires.

Notre étude a ainsi montré qu'il est possible de découpler l'activité de reconnaissance des récepteurs par G et son activité de fusion. Ceci ouvre donc la voie à la possibilité de développer à façon des glycoprotéines recombinantes à tropisme modifié.

A titre d'exemple, une glycoprotéine ayant (i) une mutation ponctuelle qui supprime le tropisme naturel de G (i.e. sa capacité à reconnaître les domaines CR des membres de la famille des récepteurs du LDL) et (ii) l'insertion d'un nanobody ayant une spécificité pour un antigène de cellule tumorale, pourrait permettre la conception de VSV oncolytiques entièrement reciblés (Figure 52).

Ces G modifiées pourraient être incorporées dans des liposomes ou des exosomes et être utilisées pour acheminer des cargos au niveaux de tissus spécifiques (Figure 52). Cette utilisation pourrait permettre de délivrer spécifiquement une molécule thérapeutique, une protéine ou encore un acide nucléique, dans des cellules données.

Cette possibilité de développer à façon une G de VSV recombinante à tropisme modifié a permis l'élaboration d'un brevet (N° EP17306255) sur l'utilisation de mutants de VSV G à des fins de vectorisation.

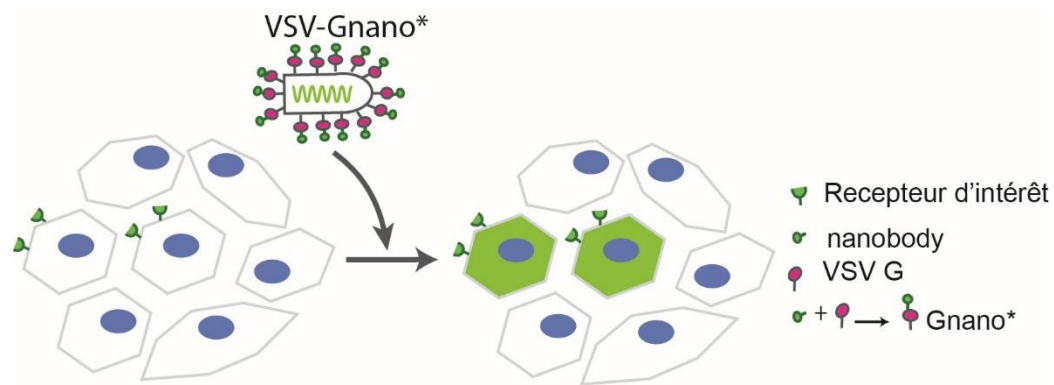


Figure 52. Schéma illustrant le ciblage de cellules d'intérêt avec VSV Gnano*.

La construction d'un virus dont la G contient un nanobody (Gnano*) permet l'infection sélective de cellules possédant le récepteur d'intérêt.

2. Caractérisation structurale de VSV G en complexe avec un anticorps neutralisant

De façon générale, les glycoprotéines des virus enveloppés sont les principales cibles des anticorps lors de l'infection virale. Il est donc important d'améliorer les connaissances sur l'antigénicité des glycoprotéines des virus enveloppés.

2.1. 2.1. Caractérisation de l'interaction entre VSV G et le Fab 8G5F11

La caractérisation biochimique de l'interaction entre VSV G et le Fab 8G5F11, a permis de montrer que l'interaction se faisait aussi bien à pH supérieur à 7, correspondant au pH du milieu extracellulaire dans lequel le virus circulant peut rencontrer les anticorps ; qu'à pH acide (pH rencontré au sein des endosomes). Cela signifie que l'épitope de l'anticorps 8G5F11 reste structuré lors de la transition structurale de G ; il est donc présent à la surface des formes pré- et post-fusion.

Une étude menée par un autre groupe avant ce travail a permis de localiser l'épitope de 8G5F11 au sommet du PHD de G dans une hélice α proche des régions charnières qui permettent le réarrangement de la protéine lors de la transition structurale (Munis et al., 2018) (Figure 53). Cette localisation de l'épitope permet d'expliquer certains résultats obtenus dans notre étude. En effet, la faible variation de l'épaisseur de la couche de glycoprotéines à la surface des particules virales à pH 6 quand celles-ci sont incubées en présence de l'anticorps, en comparaison de celle observée à pH 8 par microscopie électronique après coloration négative (Figure 35) est très certainement due à l'emplacement du site de reconnaissance du Fab 8G5F11 sur G.

En effet, l'épitope est constitué de résidus exposés au sommet de G lorsqu'elle se trouve sous conformation pré-fusion. Lorsque G se restructure dans sa conformation post-fusion, ces résidus se retrouvent 40 Å plus bas (Figure 53).

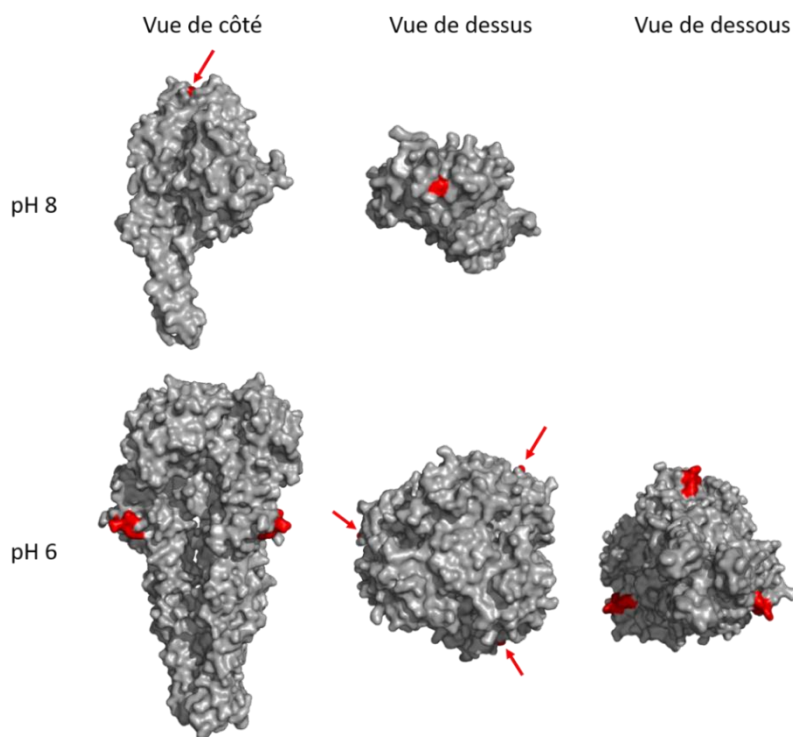


Figure 53. Localisation de l'épitope reconnu par l'anticorps 8G5F11.

L'épitope reconnu par l'anticorps 8G5F11 est coloré en rouge et est positionné sur la structure de VSV G en représentation de surface, sous sa conformation pré- et post-fusion (PDB : 5i2s et 5i2m). Sur certaines vues l'épitope n'est pas facilement distinguable, il est alors pointé par des flèches rouges.

Aussi, lorsque les Fab se fixent à G à la surface des particules virales à pH 6, pour atteindre leur épitope, ils s'intercalent entre les G sous conformation post-fusion ce qui explique le désordre dans la couche de G qui est bien structurée au même pH, en absence des Fab (Figure 54).

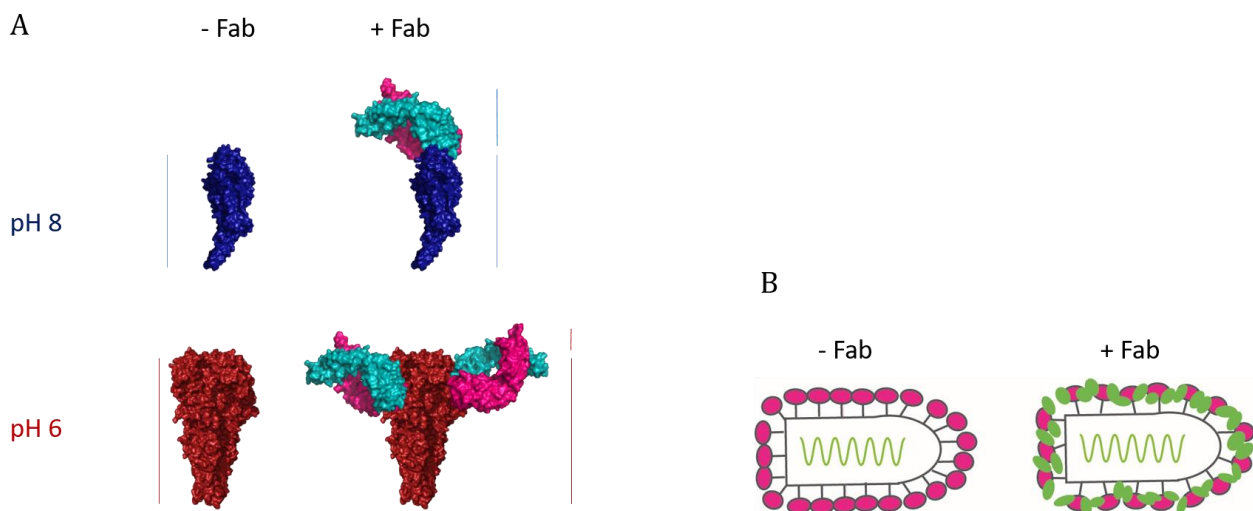


Figure 54. Variation de l'épaisseur de la couche de G à la surface des particules virales en présence des Fab.

A. Pour chaque pH, les structures de VSV G sont représentées en présence et en absence de Fab (situés au site de fixation prédit, l'orientation du Fab ayant été choisie de manière arbitraire). Ces schémas permettent de comprendre pourquoi la variation de l'épaisseur de la couche de G en surface des particules virales (représentée par les traits verticaux à côté des éléments qu'ils déterminent) est moins importante à pH 6 qu'à pH 8. **B.** En absence des Fab la couche de G à la surface des particules virales est compacte et bien organisée. La fixation des Fab sur les G sous conformation post-fusion à la surface des particules virales désordonne la couche de G en surface.

2.2. Mécanisme de neutralisation des Fab

Des expériences ont suggéré que l'anticorps 8G5F11 n'interfère pas avec la reconnaissance des récepteurs et qu'ils permettent l'internalisation des particules lentivirales portant à leur surface VSV G (LV), par les cellules cibles (Munis et al., 2018). Cette même étude montre que bien que les LV soient internalisés, l'étape de transcription n'a pas lieu, ce qui suggère que les anticorps 8G5F11 interfèrent avec les mécanismes d'infection après la liaison au récepteur et l'internalisation des particules (Munis et al., 2018).

Ces données, ajoutées à la localisation de l'épitope de 8G5F11 près de régions charnières permettant la transition structurale, supposeraient que 8G5F11 interfère avec les changements conformationnels et donc la fusion membranaire. L'anticorps pourrait aussi interférer avec la formation du réseau hélicoïdal de G dans leur conformation post-fusion dont il a été proposé qu'il joue un rôle aux étapes tardives de la fusion (i.e. aggrandissement du pore initial de fusion menant à la fusion complète).

2.3. Structure du complexe G-Fab 8G5F11

Nous allons également poursuivre nos efforts pour obtenir des informations structurales à haute résolution du complexe G-Fab par cryo-EM. L'obtention d'une telle structure serait la première pour un Rhabdovirus. Cela pourrait nous permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires de neutralisation et d'échappement à la reconnaissance chez les mutants antigéniques.

En effet, une des limites de l'utilisation de G en virothérapie est que l'organisme produit rapidement des anticorps neutralisants qui vont limiter la multiplication du virus et donc limiter son efficacité en oncothérapie. Connaître la structure de VSV G avec des anticorps neutralisants apporterait des connaissances qui pourraient aider à contrecarrer la limite de l'utilisation de VSV en oncothérapie.

3. Structure de la G des Lyssavirus

Pendant longtemps, on a pensé que seul le RABV était responsable de la maladie de la rage. A présent 16 espèces différentes ont été classifiées dans le genre des Lyssavirus. Parmi elles les virus DUVV, MOKV et WCBV qui produisent tous une encéphalite cliniquement indiscernable de celle de la rage classique et mortelle. Cependant les vaccins actuels ne protègent que de la souche RABV. A l'heure actuelle 59 000 décès sont imputables à la rage chaque année (Broban et al., 2018; Hampson et al., 2015). Néanmoins, avec les bouleversements des écosystèmes de nombreux Lyssavirus pourraient se retrouver un peu plus au contact des animaux domestiques et donc des populations humaines, comme les vaccins actuels ne protègent pas contre ces virus récemment identifiés, le nombre de décès annuels pourrait encore augmenter. Développer un vaccin polyvalent efficace contre plusieurs Lyssavirus constituerait un progrès dans le domaine de la santé publique.

C'est une des raisons pour laquelle obtenir la structure de G de Lyssavirus serait très utile pour la conception rationnelle de molécules ciblant la G de virus induisant la rage et interférant avec les propriétés de reconnaissance des récepteurs ou de fusion membranaire de G. Par exemple la connaissance de la structure de RABV G s'additionnant au positionnement des sites antigéniques majeurs neutralisants (largement étudiés) à sa surface, ainsi que l'alignement des séquences des autres G de Lyssavirus, pourraient constituer une base rationnelle pour la conception d'un vaccin à large spectre (préventif ou curatif) protégeant contre la plupart des Lyssavirus.

3.1. L'étude de l'ectodomaine de G des Lyssavirus

Nous avons utilisé les constructions contenant des mutations au niveau des boucles de fusion. Cela nous a permis d'obtenir des quantités de protéine suffisantes pour l'étude structurale par cristallographie. Cependant seuls des cristaux d'ectodomains de GPV avec une étiquette double strep ont été obtenus (soit 35 résidus supplémentaires en C-terminal de la construction). Il est fort possible que cette partie soit très flexible et interfère avec les processus de cristallisation. La présence de cette longue étiquette pourrait aussi expliquer le fait qu'aucun trimère isolé n'ait été observé à pH 6 par microscopie électronique.

Parmi les ectodomains de G exprimés, GWCBV se démarque des autres. En effet, à pH 5,5, GWCBV forme des tubes issus de l'auto-association de G entre elles *via* des contacts latéraux. Ceci est réminiscent des tubes formés par l'auto-association de VSV G en présence de liposomes à pH < 6. A la surface de ces tubes protéolipidiques, on aperçoit les réseaux hexagonaux formés par G caractéristiques de ceux retrouvés à la surface des particules virales à pH 6 (Libersou, 2010).

Il semble donc que la capacité de la forme post-fusion de G à former des réseaux réguliers soit une propriété des Rhabdovirus. La conservation de cette propriété suggère qu'elle a un rôle fonctionnel. Pour VSV, il a été suggéré que ce réseau serait impliqué dans l'agrandissement du pore de fusion.

De tels réseaux ont été observés avec les protéines fusogènes d'autres familles virales. Par exemple, on retrouve des réseaux plus ou moins réguliers formés par HA à la surface des particules virales d'Influenza A et C à pH neutre (Hewat et al., 1984; Nishimura et al., 1990) (i.e. sous leur forme pré-fusion).

De même, la plupart des protéines de classe II forment des assemblages respectant la symétrie icosaédrique dans leur conformation pré-fusion. A bas pH, cette organisation est détruite mais, dans ces conditions, l'insertion de l'ectodomaine de la glycoprotéine E1 de SFV (dans sa conformation post-fusion) dans des liposomes s'accompagne de la formation d'un réseau hexagonal plan (Gibbons et al., 2003). Il en va de même pour la glycoprotéine E des flavivirus. La capacité des protéines fusogènes à former des réseaux cristallins à la surface des membranes semble donc largement répandue, puisqu'on l'observe pour des protéines fusogènes de classe I (HA de Influenza), de classe II (E1 de SFV, E des flavivirus) et de classe III (G de VSV et de WCBV).

Il convient de noter que les réseaux formés par GWCBV sont visualisés en absence de membrane avec une protéine dont les boucles de fusion sont mutées, il n'est donc pas certain que cette observation soit pertinente dans un contexte viral. Il sera intéressant à présent d'étudier la capacité de GWCBV à former des réseaux dans le contexte viral ou bien encore à la surface de pseudotypes.

3.2. L'étude de la forme complète de GPV

Le domaine transmembranaire et le domaine proximal de la G sont essentiels à la fusion, plus précisément pour l'élargissement du pore de fusion. En son absence, la fusion est bloquée au stade de l'hémifusion (Jeetendra et al., 2003; Odell et al., 1997). Pour RABV, le domaine transmembranaire semble aussi essentiel pour le repliement correct de la conformation pré-fusion (Maillard and Gaudin, 2002). Il serait donc très utile de connaître la structure de la forme complète de la G d'un Lyssavirus (c'est-à-dire avec son domaine transmembranaire). Nous avons mis au point les conditions de cryo-EM pour GPV_n ce qui est encourageant pour envisager l'obtention de la structure par cryo-EM.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou-Hamdan, A., Belot, L., Albertini, A., and Gaudin, Y. (2018). Monomeric Intermediates Formed by Vesiculovirus Glycoprotein during Its Low-pH-induced Structural Transition. *J. Mol. Biol.* *430*, 1685–1695.
- Abraham, G., Rhodes, D.P., and Banerjee, A.K. (1975). The 5' terminal structure of the methylated mRNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus. *Cell* *5*, 51–58.
- Albecka, A., Belouzard, S., Op de Beeck, A., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y., and Dubuisson, J. (2012). Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* *55*, 998–1007.
- Albertini, A.A., Mérigoux, C., Libersou, S., Madiona, K., Bressanelli, S., Roche, S., Lepault, J., Melki, R., Vachette, P., and Gaudin, Y. (2012). Characterization of Monomeric Intermediates during VSV Glycoprotein Structural Transition. *PLoS Pathog.* *8*, 1–12.
- Albertini, A.A.V., Wernimont, A.K., Muziol, T., Ravelli, R.B.G., Clapier, C.R., Schoehn, G., Weissenhorn, W., and Ruigrok, R.W.H. (2006). Crystal Structure of the Rabies Virus Nucleoprotein-RNA Complex. *Science* *313*, 5.
- Albertini, A.A.V., Ruigrok, R.W.H., and Blondel, D. (2011). Rabies virus transcription and replication. *Adv. Virus Res.* *79*, 1–22.
- Albisetti, G.W., Ghanem, A., Foster, E., Conzelmann, K.-K., Zeilhofer, H.U., and Wildner, H. (2017). Identification of Two Classes of Somatosensory Neurons That Display Resistance to Retrograde Infection by Rabies Virus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *37*, 10358–10371.
- Amirache, F., Lévy, C., Costa, C., Mangeot, P.-E., Torbett, B.E., Wang, C.X., Nègre, D., Cosset, F.-L., and Verhoeyen, E. (2014). Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* *123*, 1422–1424.
- Assenberg, R., Delmas, O., Morin, B., Graham, S.C., De Lamballerie, X., Laubert, C., Coutard, B., Grimes, J.M., Neyts, J., Owens, R.J., et al. (2010). Genomics and structure/function studies of Rhabdoviridae proteins involved in replication and transcription. *VIZIER Proj. Deciphering World RNA Viruses* *87*, 149–161.
- Baker, K. A., Dutch, R. E., Lamb, R. A., & Jardetzky, T. S. (1999). Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Molecular Cell* *3*, 309–319.
- Backovic, M., Longnecker, R., & Jardetzky, T. S. (2009). Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 2880–2885.
- Backovic, M., and Krey, T. (2016). Stable Drosophila Cell Lines: An Alternative Approach to Exogenous Protein Expression. In *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*, Springer, *58*, 349–358.
- Badrane, H., and Tordo, N. (2001). Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J. Virol.* *75*, 8096–8104.
- Bakker, A.B.H., Marissen, W.E., Kramer, R.A., Rice, A.B., Weldon, W.C., Niezgod, M., Hanlon, C.A., Thijsse, S., Backus, H.H.J., de Kruif, J., et al. (2005). Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual in vitro escape mutants. *J. Virol.* *79*, 9062–9068.
- Banyard, A.C., Evans, J.S., Luo, T.R., and Fooks, A.R. (2014). Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses* *6*, 2974–2990.
- Baquero, E., Albertini, A.A., and Gaudin, Y. (2015a). Recent mechanistic and structural insights on class III viral fusion glycoproteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *33*, 52–60.
- Baquero, E., Albertini, A.A., Raux, H., Buonocore, L., Rose, J.K., Bressanelli, S., and Gaudin, Y. (2015b). Structure of the Low pH Conformation of Chandipura Virus G Reveals Important Features in the Evolution of the Vesiculovirus Glycoprotein. *PLoS Pathog.* *11*, 1–19.
- Baquero, E., Albertini, A.A., Raux, H., Abou-Hamdan, A., Boeri-Erba, E., Ouldali, M., Buonocore, L., Rose, J.K., Lepault, J., Bressanelli, S., et al. (2017). Structural intermediates in the fusion-associated transition of vesiculovirus glycoprotein. *EMBO J.* *36*, 679–692.

- Barr, J.N., Whelan, S.P.J., and Wertz, G.W. (1997). cis-Acting Signals Involved in Termination of Vesicular Stomatitis Virus mRNA Synthesis Include the Conserved AUAC and the U7 Signal for Polyadenylation. *J Virol* 71, 8718–8725.
- Battisti, A.J., Meng, G., Winkler, D.C., McGinnes, L.W., Plevka, P., Steven, A.C., Morrison, T.G., and Rossmann, M.G. Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 5.
- Bauer, A., Nolden, T., Nemitz, S., Perlson, E., and Finke, S. (2015). A Dynein Light Chain 1 Binding Motif in Rabies Virus Polymerase L Protein Plays a Role in Microtubule Reorganization and Viral Primary Transcription. *J. Virol.* 89, 9591–9600.
- Bearzotti, M., Delmas, B., Lamoureux, A., Loustau, A.-M., Chilmunczyk, S., and Bremont, M. (1999). Fish Rhabdovirus Cell Entry Is Mediated by Fibronectin. *J Virol* 73, 7703–7709.
- Beglova, N., and Blacklow, S.C. (2005). The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem. Sci.* 30, 309–317.
- Beilstein, F., Obiang, L., Raux, H., and Gaudin, Y. (2015). Characterization of the Interaction between the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and the Immunoproteasome Subunit LMP2. *J. Virol.* 89, 11019–11029.
- Ben Khalifa, Y., Luco, S., Besson, B., Sonthonnax, F., Archambaud, M., Grimes, J.M., Larrous, F., and Bourhy, H. (2016). The matrix protein of rabies virus binds to RelA43 to modulate NF- κ B-dependent gene expression related to innate immunity. *Sci. Rep.* 6, 39420–39432.
- Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A., and Lafay, F. (1991). Antigenicity of Rabies Virus Glycoprotein. *J Virol* 65, 4198–4203.
- Benton, D.J., Nans, A., Calder, L.J., Turner, J., Neu, U., Lin, Y.P., Ketelaars, E., Kallewaard, N.L., Corti, D., Lanzavecchia, A., et al. (2018). Influenza hemagglutinin membrane anchor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 10112–10117.
- Bieniasz, P.D. (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344, 55–63.
- Bishnoi, S., Tiwari, R., Gupta, S., Byrareddy, S.N., and Nayak, D. (2018). Oncotargeting by Vesicular Stomatitis Virus (VSV): Advances in Cancer Therapy. *Viruses* 10, 1–20.
- Black, B.L., and Lyles, D.S. (1992). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo. *J. Virol.* 66, 4058–4064.
- Blasdell, K.R., Voysey, R., Bulach, D., Joubert, D.A., Tesh, R.B., Boyle, D.B., and Walker, P.J. (2012). Kotonkan and Obodhiang viruses: African ephemeroviruses with large and complex genomes. *Virology* 425, 143–153.
- Blondel, D., Regad, T., Poisson, N., Pavie, B., Harper, F., Pandolfi, P.P., de Thé, H., and Chelbi-Alix, M.K. (2002). Rabies virus P and small P products interact directly with PML and reorganize PML nuclear bodies. *Oncogene* 21, 7957–7970.
- Bloor, S., Maelfait, J., Krumbach, R., Beyaert, R., and Randow, F. (2010). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is essential for infection with vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6970–6975.
- Bloyet, L.-M., Welsch, J., Enchery, F., Mathieu, C., de Breyne, S., Horvat, B., Grigorov, B., and Gerlier, D. (2016). HSP90 Chaperoning in Addition to Phosphoprotein Required for Folding but Not for Supporting Enzymatic Activities of Measles and Nipah Virus L Polymerases. *J. Virol.* 90, 6642–6656.
- Blumberg, B.M., and Kolakofsky, D. (1983). An Analytical Review of Defective Infections of Vesicular Stomatitis Virus. *J. Gen. Virol.* 64, 1839–1847.
- Blumberg, B.M., Leppert, M., and Kolakofsky, D. (1981). Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell* 23, 837–845.
- Both, L., Banyard, A.C., Dolleweerd, C. van, Horton, D.L., Ma, J.K.-C., and Fooks, A.R. (2012). Passive immunity in the prevention of rabies. *Lancet Infect. Dis.* 12, 397–407.
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F. X., & Rey, F. A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO Journal*, 23, 728–738.

- Broban, A., Tejiokem, M.C., Tiembré, I., Druelles, S., and L'Azou, M. (2018). Bolstering human rabies surveillance in Africa is crucial to eliminating canine-mediated rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *12*, 1–7.
- Bron, R., Wahlberg, J.M., Garoff, H., and Wilschut, J. (1993). Membrane fusion of Semliki Forest virus in a model system: correlation between fusion kinetics and structural changes in the envelope glycoprotein. *EMBO J.* *12*, 693–701.
- Brookes, S.M., Aegerter, J.N., Smith, G.C., Healy, D.M., Jolliffe, T.A., Swift, S.M., Mackie, I.J., Pritchard, J.S., Racey, P.A., Moore, N.P., et al. (2005). European bat lyssavirus in Scottish bats. *Emerg. Infect. Dis.* *11*, 572–578.
- Brown, E.L., and Lyles, D.S. (2003). Organization of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein into Membrane Microdomains Occurs Independently of Intracellular Viral Components. *J. Virol.* *77*, 3985–3992.
- Brown, M., and Goldstein, J. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* *232*, 34–47.
- Brzozka, K., Finke, S., and Conzelmann, K.-K. (2006). Inhibition of Interferon Signaling by Rabies Virus Phosphoprotein P: Activation-Dependent Binding of STAT1 and STAT2. *J. Virol.* *80*, 2675–2683.
- Bu, G., and Marzolo, M.P. (2000). Role of rap in the biogenesis of lipoprotein receptors. *Trends Cardiovasc. Med.* *10*, 148–155.
- Bujnicki, J.M., and Rychlewski, L. In silico identification, structure prediction and phylogenetic analysis of the 2J-O-ribose (cap 1) methyltransferase domain in the large structural protein of ssRNA negative-strand viruses. *Protein Eng.* *15*, 101–108.
- Burrage, T.G., Tignor, G.H., and Smith, A.L. (1985). Rabies virus binding at neuromuscular junctions. *Virus Res.* *2*, 273–289.
- Buzon, V., Natrajan, G., Schibli, D., Campelo, F., Kozlov, M. M., & Weissenhorn, W. (2010). Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathogens*, *6*, 1–7.
- Cai, K., Feng, J., Wang, Q., Li, T., Shi, J., Hou, X., Gao, X., Liu, H., Tu, W., Xiao, L., et al. (2010). Fine mapping and interaction analysis of a linear rabies virus neutralizing epitope. *Microbes Infect.* *12*, 948–955.
- Carneiro, F.A., Stauffer, F., Lima, C.S., Juliano, M.A., Juliano, L., and Da Poian, A.T. (2003). Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation. *J. Biol. Chem.* *278*, 13789–13794.
- Carr, C.M., Chaudhry, C., and Kim, P.S. (1997). Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 14306–14313.
- Castel, G., Chteoui, M., Caignard, G., Prehaud, C., Mehouas, S., Real, E., Jallet, C., Jacob, Y., Ruigrok, R.W.H., and Tordo, N. (2009). Peptides That Mimic the Amino-Terminal End of the Rabies Virus Phosphoprotein Have Antiviral Activity. *J. Virol.* *83*, 10808–10820.
- Castellanos, J.E., Castañeda, D.R., Velandia, A.E., and Hurtado, H. (1997). Partial inhibition of the in vitro infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons by rabies virus using nicotinic antagonists. *Neurosci. Lett.* *229*, 198–200.
- Champion, J.M., Kean, R.B., Rupprecht, C.E., Notkins, A.L., Koprowski, H., Dietzschold, B., and Hooper, D.C. (2000). The development of monoclonal human rabies virus-neutralizing antibodies as a substitute for pooled human immune globulin in the prophylactic treatment of rabies virus exposure. *J. Immunol. Methods* *235*, 81–90.
- Chao, T.-Y., Ren, S., Shen, E., Moore, S., Zhang, S.-F., Chen, L., Rupprecht, C.E., and Tsao, E. (2017). SYN023, a novel humanized monoclonal antibody cocktail, for post-exposure prophylaxis of rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *11*, 1–20.
- Chen, J., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1999). N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*, 8967–8972.
- Chen, B.J., and Lamb, R.A. (2008). Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology* *372*, 221–232.

- Chen, Z., Green, T.J., Luo, M., and Li, H. (2004). Visualizing the RNA Molecule in the Bacterially Expressed Vesicular Stomatitis Virus Nucleoprotein-RNA Complex. *Structure* 12, 227–235.
- Cheng, C.Y., Shih, W.L., Huang, W.R., Chi, P.I., Wu, M.H., and Liu, H.J. (2012). Bovine Ephemeral Fever Virus Uses a Clathrin-Mediated and Dynamin 2-Dependent Endocytosis Pathway That Requires Rab5 and Rab7 as Well as Microtubules. *J. Virol.* 86, 13653–13661.
- Chenik, M., Chebli, K., and Blondel, D. (1995). Translation Initiation at Alternate In-Frame AUG Codons in the Rabies Virus Phosphoprotein mRNA Is Mediated by a Ribosomal Leaky Scanning Mechanism. *J Virol* 69, 707–712.
- Chenik, M., Schnell, M., Conzelmann, K.K., and Blondel, D. (1998). Mapping the Interacting Domains between the Rabies Virus Polymerase and Phosphoprotein. *J Virol* 72, 1925–1930.
- Chernomordik, L.V., and Kozlov, M.M. (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 675–683.
- Chernomordik, L.V., Frolov, V.A., Leikina, E., Bronk, P., and Zimmerberg, J. (1998). The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J. Cell Biol.* 140, 1369–1382.
- Ci, Y., Yang, Y., Xu, C., and Shi, L. (2018). Vesicular stomatitis virus G protein transmembrane region is crucial for the hemi-fusion to full fusion transition. *Sci. Rep.* 8, 10669–10679.
- Clague, M.J., Schoch, C., Zech, L., and Blumenthal, R. (1990). Gating kinetics of pH-activated membrane fusion of vesicular stomatitis virus with cells: stopped-flow measurements by dequenching of octadecylrhodamine fluorescence. *Biochemistry* 29, 1303–1308.
- Cleverley, D.Z., and Lenard, J. (1998). The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3425–3430.
- Cohen, F.S., and Melikyan, G.B. (2004). The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J. Membr. Biol.* 199, 1–14.
- Coil, D.A., and Miller, A.D. (2004). Phosphatidylserine Is Not the Cell Surface Receptor for Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* 78, 10920–10926.
- Connor, J.H., McKenzie, M.O., and Lyles, D.S. (2006). Role of Residues 121 to 124 of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein in Virus Assembly and Virus-Host Interaction. *J. Virol.* 80, 3701–3711.
- Conti, C., Superti, F., and Tsiang, H. (1986). Membrane Carbohydrate Requirement for Rabies Virus Binding to Chicken Embryo Related Cells. *Intervirology* 26, 164–168.
- Conzelmann, K.-K. (1998). NONSEGMENTED NEGATIVE-STRAND RNA VIRUSES: Genetics and Manipulation of Viral Genomes. *Annu. Rev. Genet.* 32, 123–162.
- Conzelmann, K.-K., and Schnell, Mat. (1994). Rescue of Synthetic Genomic RNA Analogs of Rabies Virus by Plasmid-Encoded Proteins. *J Virol* 68, 713–719.
- Corver, J., Ortiz, A., Allison, S.L., Schalich, J., Heinz, F.X., and Wilschut, J. (2000). Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology* 269, 37–46.
- Coulon, P., Rollin, P.E., and Flamand, A. (1983). Molecular basis of rabies virus virulence. II. Identification of a site on the CVS glycoprotein associated with virulence. *J. Gen. Virol.* 64, 693–696.
- Coulon, P., Ternaux, J.-P., Flamand, A., and Tuffereau, C. (1998). An Avirulent Mutant of Rabies Virus Is Unable To Infect Motoneurons In Vivo and In Vitro. *J. Virol.* 72, 273–278.
- Crimmins, D.L., Mehard, W.B., and Schlesinger, S. (1983). Physical properties of a soluble form of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus at neutral and acidic pH. *Biochemistry* 22, 5790–5796.
- Cureton, D.K., Massol, R.H., Saffarian, S., Kirchhausen, T.L., and Whelan, S.P.J. (2009). Vesicular Stomatitis Virus Enters Cells through Vesicles Incompletely Coated with Clathrin That Depend upon Actin for Internalization. *PLOS Pathog.* 5, 1–15.

- Cureton, D.K., Massol, R.H., Whelan, S.P.J., and Kirchhausen, T. (2010). The Length of Vesicular Stomatitis Virus Particles Dictates a Need for Actin Assembly during Clathrin-Dependent Endocytosis. *PLoS Pathog.* *6*, 1–12.
- Cybinski, D.H., Kongsuwan, K., Walker, P.J., and Cooper, J. (1998). Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *J. Gen. Virol.* *79*, 2573–2581.
- Dessen, A. (2000). Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *EMBO J.* *19*, 4228–4236.
- Dietzgen, R.G., Kondo, H., Goodin, M.M., Kurath, G., and Vasilakis, N. (2017). The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Res.* *227*, 158–170.
- Dietzschold, B., Wunner, W.H., Wiktor, T.J., Lopes, A.D., Lafon, M., Smith, C.L., and Koprowski, H. (1983). Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 70–74.
- Dietzschold, B., Gore, M., Marchadier, D., Niu, H.S., Bunschoten, H.M., Otvos, L., Wunner, W.H., Ertl, H.C., Osterhaus, A.D., and Koprowski, H. (1990). Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J. Virol.* *64*, 3804–3809.
- Ding, H., Green, T.J., Lu, S., and Luo, M. (2006). Crystal Structure of the Oligomerization Domain of the Phosphoprotein of Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* *80*, 2808–2814.
- Doms, R.W., Keller, D.S., Helenius, A., and Balch, W.E. (1987). Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *J. Cell Biol.* *105*, 1957–1969.
- Drolet, B.S., Stuart, M.A., and Derner, J.D. (2009). Infection of *Melanoplus sanguinipes* Grasshoppers following Ingestion of Rangeland Plant Species Harboring Vesicular Stomatitis Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 3029–3033.
- DuBois, R., Vaney, M., Tortorici, M., Kurdi RA, Barba-Spaeth G, Krey T, Rey FA. (2013). Functional and evolutionary insight from the crystal structure of rubella virus protein E1. *Nature* *493*, 552–556.
- Durham, N.M., Mulgrew, K., McGlinchey, K., Monks, N.R., Ji, H., Herbst, R., Suzich, J., Hammond, S.A., and Kelly, E.J. (2017). Oncolytic VSV Primes Differential Responses to Immuno-oncology Therapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *25*, 1917–1932.
- Duquerroy, S., Vigouroux, A., Rottier, P. J., Rey, F. A., & Bosch, B. J. (2005). Central ions and lateral asparagine/glutamine zippers stabilize the post-fusion hairpin conformation of the SARS coronavirus spike glycoprotein. *Virology*, *335*, 276–285.
- Edson, M.A., Lin, Y.-N., and Matzuk, M.M. (2010). Deletion of the novel oocyte-enriched gene, *Gpr149*, leads to increased fertility in mice. *Endocrinology* *151*, 358–368.
- Efrat, A., Chernomordik, L.V., and Kozlov, M.M. (2007). Point-like protrusion as a prestalk intermediate in membrane fusion pathway. *Biophys. J.* *92*, 61–63.
- Emerson, S.U. (1982). Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome. *Cell* *31*, 635–642.
- Erk, I., Michel, M., and Lepault, J. (1996). Electron cryo-microscopy of vitrified bulk biological specimens: ideal and real structures of water-lipid phases. *J. Microsc.* *182*, 15–23.
- Evans, J.S., Horton, D.L., Easton, A.J., Fooks, A.R., and Banyard, A.C. (2012). Rabies virus vaccines: Is there a need for a pan-lyssavirus vaccine? *Vaccine* *30*, 7447–7454.
- Evans, J.S., Selden, D., Wu, G., Wright, E., Horton, D.L., Fooks, A.R., and Banyard, A.C. (2018). Antigenic site changes in the rabies virus glycoprotein dictates functionality and neutralizing capability against divergent lyssaviruses. *J. Gen. Virol.* *99*, 169–180.
- Faber, M., Pulmanusahakul, R., Nagao, K., Prośniak, M., Rice, A.B., Koprowski, H., Schnell, M.J., and Dietzschold, B. (2004). Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 16328–16332.

- Fallahi, F., Wandeler, A.I., and Nadin-Davis, S.A. (2016). Characterization of epitopes on the rabies virus glycoprotein by selection and analysis of escape mutants. *Virus Res.* *220*, 161–171.
- Faria, P.A., Chakraborty, P., Levay, A., Barber, G.N., Ezelle, H.J., Enninga, J., Arana, C., van Deursen, J., and Fontoura, B.M.A. (2005). VSV Disrupts the Rae1/mrnp41 mRNA Nuclear Export Pathway. *Mol. Cell* *17*, 93–102.
- Finlin, A., Raux, H., Baquero, E., Lepault, J., and Gaudin, Y. (2014). Characterization of pH-sensitive molecular switches that trigger the structural transition of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the postfusion state toward the prefusion state. *J. Virol.* *88*, 13396–13409.
- Fernandez-Alonso, M., Lorenzo, G., Perez, L., Bullido, R., Estepa, A., Lorenzen, N., and Coll, J. (1998). Mapping of linear antibody epitopes of the glycoprotein of VHSV, a salmonid rhabdovirus. *Dis. Aquat. Organ.* *34*, 167–176.
- Finke, S. (2003). Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J. Gen. Virol.* *84*, 1613–1621.
- Finke, S., and Conzelmann, K.-K. (1997). Ambisense Gene Expression from Recombinant Rabies Virus: Random Packaging of Positive- and Negative-Strand Ribonucleoprotein Complexes into Rabies Virions. *J. Virol.* *71*, 7181–7288.
- Finke, S., and Conzelmann, K.-K. (2003). Dissociation of Rabies Virus Matrix Protein Functions in Regulation of Viral RNA Synthesis and Virus Assembly. *J. Virol.* *77*, 12074–12082.
- Finke, S., Cox, J.H., and Conzelmann, K.-K. (2000). Differential Transcription Attenuation of Rabies Virus Genes by Intergenic Regions: Generation of Recombinant Viruses Overexpressing the Polymerase Gene. *J. Virol.* *74*, 7261–7269.
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 7306–7311.
- Flamand, A., and Delagneau, J.F. (1978). Transcriptional Mapping of Rabies Virus In Vivo. *J. Virol.* *28*, 518–523.
- Flamand, A., Raux, H., Gaudin, Y., and Ruigrok, R.W. (1993). Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology* *194*, 302–313.
- Fouquet, B., Nikolic, J., Larrous, F., Bourhy, H., Wirblich, C., Lagaudrière-Gesbert, C., and Blondel, D. (2015). Focal Adhesion Kinase Is Involved in Rabies Virus Infection through Its Interaction with Viral Phosphoprotein P. *J. Virol.* *89*, 1640–1651.
- François-Martin, C., Rothman, J.E., and Pincet, F. (2017). Low energy cost for optimal speed and control of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 1238–1241.
- Fredericksen, B.L., and Whitt, M.A. (1996). Mutations at Two Conserved Acidic Amino Acids in the Glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus Affect pH-Dependent Conformational Changes and Reduce the pH Threshold for Membrane Fusion. *Virology* *217*, 49–57.
- Gaddy, D.F., and Lyles, D.S. (2005). Vesicular Stomatitis Viruses Expressing Wild-Type or Mutant M Proteins Activate Apoptosis through Distinct Pathways. *J. Virol.* *79*, 4170–4179.
- Garry, C. E., & Garry, R. F. (2004). Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes). *Theoretical Biology and Medical Modelling*, *1*, 10.
- Garry, C. E., & Garry, R. F. (2009). Proteomics computational analyses suggest that the bornavirus glycoprotein is a class III viral fusion protein (gamma penetrene). *Virology Journal*, *6*, 145.
- Gastka, M., Horvath, J., and Lentz, T.L. (1996). Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. *J. Gen. Virol.* *77*, 2437–2440.
- Gaudier, M. (2002). Crystal structure of vesicular stomatitis virus matrix protein. *EMBO J.* *21*, 2886–2892.
- Gaudin, Y. (1996). Identification of Amino Acids Controlling the Low-pH-Induced Conformational Change of Rabies Virus Glycoprotein. *J. Virol.* *70*, 7371–7378.

- Gaudin, Y. (1997). Folding of Rabies Virus Glycoprotein: Epitope Acquisition and Interaction with Endoplasmic Reticulum Chaperones. *J Virol* *71*, 3742–3750.
- Gaudin, Y. (2000a). Rabies Virus-Induced Membrane Fusion Pathway. *J. Cell Biol.* *150*, 601–612.
- Gaudin, Y. (2000b). Reversibility in fusion protein conformational changes. The intriguing case of rhabdovirus-induced membrane fusion. *Subcell. Biochem.* *34*, 379–408.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Benmansour, A., and Flamand, A. (1991a). Fatty acylation of rabies virus proteins. *Virology* *184*, 441–444.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Segretain, D., Knossow, M., and Flamand, A. (1991b). Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* *65*, 4853–4859.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R.W.H., Knossow, M., and Flamand, A. (1993). Low-pH Conformational Changes of Rabies Virus Glycoprotein and Their Role in Membrane Fusion. *J Virol* *67*, 1365–1372.
- Gaudin, Y., Barge, A., Ebel, C., and Ruigrok, R.W.H. (1995a). Aggregation of VSV M protein is reversible and mediated by nucleation sites: Implications for viral assembly. *Virology* *206*, 28–37.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Flamand, A., and Ruigrok, R.W.H. (1995b). Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. *J. Virol.* *69*, 5528–5534.
- Gaudin, Y., Sturgis, J., Doumith, M., Barge, A., Robert, B., and Ruigrok, R.W.H. (1997). Conformational flexibility and polymerization of vesicular stomatitis virus matrix protein. *J. Mol. Biol.* *274*, 816–825.
- Gaudin, Y., de Kinkelin, P., and Benmansour, A. (1999a). Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. *J. Gen. Virol.* *80* (Pt 5), 1221–1229.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Brunner, J., Flamand, A., and Ruigrok, R. (1999b). Rabies virus-induced membrane fusion. *Mol. Membr. Biol.* *16*, 21–31.
- Ge, P., Tsao, J., Schein, S., Green, T.J., Luo, M., and Zhou, Z.H. (2010). Cryo-EM Model of the Bullet-Shaped Vesicular Stomatitis Virus. *Science* *327*, 689–693.
- Genna, V., Vidossich, P., Ippoliti, E., Carloni, P., and De Vivo, M. (2016). A Self-Activated Mechanism for Nucleic Acid Polymerization Catalyzed by DNA/RNA Polymerases. *J. Am. Chem. Soc.* *138*, 14592–14598.
- Gerard, F.C.A., Ribeiro, E. de A., Albertini, A.A.V., Gutsche, I., Zaccari, G., Ruigrok, R.W.H., and Jamin, M. (2007). Unphosphorylated *Rhabdoviridae* Phosphoproteins Form Elongated Dimers in Solution †. *Biochemistry* *46*, 10328–10338.
- Gerard, F.C.A., Ribeiro, E. de A., Leyrat, C., Ivanov, I., Blondel, D., Longhi, S., Ruigrok, R.W.H., and Jamin, M. (2009). Modular Organization of Rabies Virus Phosphoprotein. *J. Mol. Biol.* *388*, 978–996.
- Gibbons, D.L., Erk, I., Reilly, B., Navaza, J., Kielian, M., Rey, F.A., and Lepault, J. (2003). Visualization of the target-membrane-inserted fusion protein of Semliki Forest virus by combined electron microscopy and crystallography. *Cell* *114*, 573–583.
- Gibbons, D. L., Vaney, M. C., Roussel, A., Vigouroux, A., Reilly, B., Lepault, J., Kielian, M., & Rey, F. A. (2004). Conformational change and protein–protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature*, *427*, 320–325.
- Gibson, R., Kornfeld, S., and Schlesinger, S. (1981). The effect of oligosaccharide chains of different sizes on the maturation and physical properties of the G protein of vesicular stomatitis virus. *J. Biol. Chem.* *256*, 456–462.
- Gluska, S., Zahavi, E.E., Chein, M., Gradus, T., Bauer, A., Finke, S., and Perlson, E. (2014). Rabies Virus Hijacks and Accelerates the p75^{NTR} Retrograde Axonal Transport Machinery. *PLoS Pathog.* *10*, 1–17.
- Graham, S.C., Assenberg, R., Delmas, O., Verma, A., Gholami, A., Talbi, C., Owens, R.J., Stuart, D.I., Grimes, J.M., and Bourhy, H. (2008). Rhabdovirus Matrix Protein Structures Reveal a Novel Mode of Self-Association. *PLoS Pathog.* *4*, 1–12.

- Green, T.J. (2006). Structure of the Vesicular Stomatitis Virus Nucleoprotein-RNA Complex. *Science* 313, 357–360.
- Green, T.J., and Luo, M. (2009). Structure of the vesicular stomatitis virus nucleocapsid in complex with the nucleocapsid-binding domain of the small polymerase cofactor, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 11713–11718.
- Guo, Y., Duan, M., Wang, X., Gao, J., Guan, Z., and Zhang, M. (2019). Early events in rabies virus infection—Attachment, entry, and intracellular trafficking. *Virus Res.* 263, 217–225.
- Hammond, C., and Helenius, A. (1994). Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science* 266, 456–458.
- Hampson, K., Coudeville, L., Lembo, T., Sambo, M., Kieffer, A., Attlan, M., Barrat, J., Blanton, J.D., Briggs, D.J., Cleaveland, S., et al. (2015). Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–20.
- Hanlon, C.A., Kuzmin, I.V., Blanton, J.D., Weldon, W.C., Manangan, J.S., and Rupprecht, C.E. (2005). Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res.* 111, 44–54.
- Hanson, R.P. (1952). THE NATURAL HISTORY OF VESICULAR STOMATITIS. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 16, 179–204.
- Harrison, S.C. (2005). Mechanism of Membrane Fusion by Viral Envelope Proteins. In *Advances in Virus Research*, pp. 231–261.
- Harrison, S.C. (2015). Viral membrane fusion. *Virology* 479–480, 498–507.
- Harty, R.N., Paragas, J., Sudol, M., and Palese, P. (1999). A Proline-Rich Motif within the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and Rabies Virus Interacts with WW Domains of Cellular Proteins: Implications for Viral Budding. *J Virol* 73, 2921–2929.
- Harty, R.N., Brown, M.E., McGettigan, J.P., Wang, G., Jayakar, H.R., Huibregtse, J.M., Whitt, M.A., and Schnell, M.J. (2001). Rhabdoviruses and the Cellular Ubiquitin-Proteasome System: a Budding Interaction. *J. Virol.* 75, 10623–10629.
- Hastie, E., Besmer, D.M., Shah, N.R., Murphy, A.M., Moerdyk-Schauwecker, M., Molestina, C., Roy, L.D., Curry, J.M., Mukherjee, P., and Grdzlishvili, V.Z. (2013). Oncolytic vesicular stomatitis virus in an immunocompetent model of MUC1-positive or MUC1-null pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Virol.* 87, 10283–10294.
- Hayman, D.T.S., Fooks, A.R., Marston, D.A., and Garcia-R, J.C. (2016). The Global Phylogeography of Lyssaviruses - Challenging the “Out of Africa” Hypothesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–13.
- Heinrich, B.S., Morin, B., Rahmeh, A.A., and Whelan, S.P.J. (2012). Structural Properties of the C Terminus of Vesicular Stomatitis Virus N Protein Dictate N-RNA Complex Assembly, Encapsidation, and RNA Synthesis. *J. Virol.* 86, 8720–8729.
- Heinrich, B.S., Maliga, Z., Stein, D.A., Hyman, A.A., and Whelan, S.P.J. (2018). Phase Transitions Drive the Formation of Vesicular Stomatitis Virus Replication Compartments. *MBio* 9, 1–10.
- Heinz, F. X., Stiasny, K., Puschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S. L., Mandl, C.W., & Kunz, C. (1994). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*, 198, 109–117.
- Heldwein, E. E., Lou, H., Bender, F. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., & Harrison, S. C. (2006). Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science*, 313, 217–220.
- Her, L.-S., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (1997). Inhibition of Ran Guanosine Triphosphatase-Dependent Nuclear Transport by the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus. *Science* 276, 1845.
- Herrmann, A., Clague, M.J., Puri, A., Morris, S.J., Blumenthal, R., and Grimaldi, S. (1990). Effect of erythrocyte transbilayer phospholipid distribution on fusion with vesicular stomatitis virus. *Biochemistry* 29, 4054–4058.
- Hewat, E.A., Cusack, S., Ruigrok, R.W., and Verwey, C. (1984). Low resolution structure of the influenza C glycoprotein determined by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 175, 175–193.

- Hinzman, E.E., Barr, J.N., and Wertz, G.W. (2008). Selection for gene junction sequences important for VSV transcription. *Virology* 380, 379–387.
- Hofer, F., Gruenberger, M., Kowalski, H., Machat, H., Huettinger, M., Kuechler, E., and Blaas, D. (1994). Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1839–1842.
- Huang, C., Chien, M.-S., Landolt, M., Batts, W., and Winton, J. (1996). Mapping the neutralizing epitopes on the glycoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *J. Gen. Virol.* 77, 3033–3040.
- Irie, T., Licata, J.M., Jayakar, H.R., Whitt, M.A., Bell, P., and Harty, R.N. (2004). Functional Analysis of Late-Budding Domain Activity Associated with the PSAP Motif within the Vesicular Stomatitis Virus M Protein. *J. Virol.* 78, 7823–7827.
- Izeni, F., Ruigrok, R.W., Blondel, D., Barge, A., and Baudin, F. (1998). Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J. Gen. Virol.* 79, 2909–2919.
- Izeni, F., Baudin, F., Blondel, D., and Ruigrok, R.W.H. (2000). Structure of the RNA inside the vesicular stomatitis virus nucleocapsid. *RNA* 6, 270–281.
- Ivanov, I., Crepin, T., Jamin, M., and Ruigrok, R.W.H. (2010). Structure of the Dimerization Domain of the Rabies Virus Phosphoprotein. *J. Virol.* 84, 3707–3710.
- Ivanov, I., Yabukarski, F., Ruigrok, R.W.H., and Jamin, M. (2011). Structural insights into the rhabdovirus transcription/replication complex. *Negat. Strand RNA Viruses Mark Retire. Dr Brian WJ Mahy Found. Ed.--Chief 1984–2011* 162, 126–137.
- Iverson, L.E., and Rose, J.K. (1981). Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* 23, 477–484.
- Jacob, Y., Badrane, H., Ceccaldi, P.-E., and Tordo, N. (2000). Cytoplasmic Dynein LC8 Interacts with Lyssavirus Phosphoprotein. *J. Virol.* 74, 10217–10222.
- Jacob, Y., Real, E., and Tordo, N. (2001). Functional Interaction Map of Lyssavirus Phosphoprotein: Identification of the Minimal Transcription Domains. *J. Virol.* 75, 9613–9622.
- Jason S. McLellan, Yongping Yang, Barney S. Graham, Peter D. Kwong. (2011). Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes. *Journal of Virology*, 85 (15) 7788-7796.
- Jayakar, H.R., Murti, K.G., and Whitt, M.A. (2000). Mutations in the PPPY Motif of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Reduce Virus Budding by Inhibiting a Late Step in Virion Release. *J. Virol.* 74, 9818–9827.
- Jayakar, H.R., Jeetendra, E., and Whitt, M.A. (2004). Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res.* 106, 117–132.
- Jeetendra, E., Ghosh, K., Odell, D., Li, J., Ghosh, H.P., and Whitt, M.A. (2003). The Membrane-Proximal Region of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G Ectodomain Is Critical for Fusion and Virus Infectivity. *J. Virol.* 77, 12807–12818.
- Johannsdottir, H.K., Mancini, R., Kartenbeck, J., Amato, L., and Helenius, A. (2009). Host Cell Factors and Functions Involved in Vesicular Stomatitis Virus Entry. *J. Virol.* 83, 440–453.
- Johnson, N., Vos, A., Freuling, C., Tordo, N., Fooks, A.R., and Müller, T. (2010). Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. *Vet. Microbiol.* 142, 151–159.
- Justice, P.A., Sun, W., Li, Y., Ye, Z., Grigera, P.R., and Wagner, R.R. (1995). Membrane Vesiculation Function and Exocytosis of Wild-Type and Mutant Matrix Proteins of Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol* 69, 3156–3160.
- Kadlec, J., Loureiro, S., Abrescia, N. G., Stuart, D. I., & Jones, I. M. (2008). The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15, 1024–1030.

- Kankanamge, P.J., Irie, T., Mannen, K., Tochikura, T.S., and Kawai, A. (2003). Mapping of the low pH-sensitive conformational epitope of rabies virus glycoprotein recognized by a monoclonal antibody #1-30-44. *Microbiol. Immunol.* *47*, 507–519.
- Keil, W., and Wagner, R.R. (1989). Epitope mapping by deletion mutants and chimeras of two vesicular stomatitis virus glycoprotein genes expressed by a vaccinia virus vector. *Virology* *170*, 392–407.
- Kim, I.S., Jenni, S., Stanifer, M.L., Roth, E., Whelan, S.P.J., van Oijen, A.M., and Harrison, S.C. (2017). Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 28–36.
- Klingen, Y., Conzelmann, K.-K., and Finke, S. (2008). Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport. *J. Virol.* *82*, 237–245.
- Krey, T., d'Alayer, J., Kikuti, C. M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D. X., Tawar, R. G., Baron, B., Robert, B., England, P., Persson, M. A., Martin, A., & Rey, F. A. (2010). The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathogens*, *6*, 1–11.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, *108*, 717–725.
- Kuzmin, P.I., Zimmerberg, J., Chizmadzhev, Y.A., and Cohen, F.S. (2001). A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 7235–7240.
- Lafay, F., Coulon, P., Astic, L., Saucier, D., Riche, D., Holley, A., and Flamand, A. (1991). Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant Av01 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. *Virology* *183*, 320–330.
- Lafay, F., Benmansour, A., Chebli, K., and Flamand, A. (1996). Immunodominant epitopes defined by a yeast-expressed library of random fragments of the rabies virus glycoprotein map outside major antigenic sites. *J. Gen. Virol.* *77*, 339–346.
- Lafon, M., Wiktor, T.J., and Macfarlan, R.I. (1983). Antigenic Sites on the CVS Rabies Virus Glycoprotein: Analysis with Monoclonal Antibodies. *J. Gen. Virol.* *64*, 843–851.
- Lahaye, X., Vidy, A., Pomier, C., Obiang, L., Harper, F., Gaudin, Y., and Blondel, D. (2009). Functional Characterization of Negri Bodies (NBs) in Rabies Virus-Infected Cells: Evidence that NBs Are Sites of Viral Transcription and Replication. *J. Virol.* *83*, 7948–7958.
- Larrous, F., Gholami, A., Mouhamad, S., Estaquier, J., and Bourhy, H. (2010). Two Overlapping Domains of a Lyssavirus Matrix Protein That Acts on Different Cell Death Pathways. *J. Virol.* *84*, 9897–9906.
- Laurioz, P.-Y. (2005). *Louis Pasteur la Réalité après la légende* (Editions de Paris).
- Le Blanc, I., Luyet, P.-P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demarex, N., Fauré, J., Sadoul, R., et al. (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat. Cell Biol.* *7*, 653–664.
- Lee, J., and Lentz, B.R. (1998). Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 9274–9279.
- Lee, A.S.-Y., Burdeinick-Kerr, R., and Whelan, S.P.J. (2013). A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 324–329.
- Lee, A.S.-Y., Burdeinick-Kerr, R., and Whelan, S.P.J. (2014). A genome-wide small interfering RNA screen identifies host factors required for vesicular stomatitis virus infection. *J. Virol.* *88*, 8355–8360.
- Lee, J.S., Kim, J., Im, S.P., Kim, S.W., Lazarte, J.M.S., Jung, J.W., Gong, T.W., Kim, Y.R., Lee, J.H., Kim, H.J., et al. (2018). Generation and characterization of hagfish variable lymphocyte receptor B against glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Mol. Immunol.* *99*, 30–38.
- Lefrancois, L., and Lyles, D.S. (1982a). The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus I. Analysis of neutralizing epitopes with monoclonal antibodies. *Virology* *121*, 157–167.

- Lefrancois, L., and Lyles, D.S. (1982b). The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus I. Analysis of neutralizing epitopes with monoclonal antibodies. *Virology* *121*, 157–167.
- Lefrancois, L., and Lyles, D.S. (1983). Antigenic determinants of vesicular stomatitis virus: analysis with antigenic variants. *J. Immunol.* *130*, 394–398.
- Lentz, T., Burrage, T., Smith, A., Crick, J., and Tignor, G. (1982). Is the Acetylcholine Receptor a Rabies Virus Receptor? *Science* *215*, 182–184.
- Lentz, T., Wilson, P., Hawrot, E., and Speicher, D. (1984). Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. *Science* *226*, 847–848.
- Lentz, T.L., Benson, R.J.J., Klimowicz, D., Wilson, P.T., and Hawrot, E. (1986). Binding of rabies virus to purified Torpedo acetylcholine receptor. *Mol. Brain Res.* *1*, 211–219.
- Lescar, J., Roussel, A., Wien, M.W., Navaza, J., Fuller, S. D., Wengler, G., Wengler, G., & Rey, F. A. (2001). The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*, *105*, 137–148.
- Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L., and Barrera, J.D.C. (1999). Vesicular Stomatitis. *Vet. J.* *157*, 239–260.
- Lewis, P., and Lentz, T.L. (1998). Rabies virus entry into cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurocytol.* *27*, 559–573.
- Lewis, P., Fu, Y., and Lentz, T.L. (1998). Rabies virus entry into endosomes in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Exp. Neurol.* *153*, 65–73.
- Leyrat, C., Yabukarski, F., Tarbouriech, N., Ribeiro, E.A., Jr., Jensen, M.R., Blackledge, M., Ruigrok, R.W.H., and Jamin, M. (2011). Structure of the Vesicular Stomatitis Virus N0-P Complex. *PLOS Pathog.* *7*, 1–12.
- Li, L., Lok, S. M., Yu, I. M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J., & Rossmann, M. G. (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*, *319*, 1830–1834.
- Liang, B., Li, Z., Jenni, S., Rahmeh, A.A., Morin, B.M., Grant, T., Grigorieff, N., Harrison, S.C., and Whelan, S.P.J. (2015). Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy. *Cell* *162*, 314–327.
- Libersou, S., Albertini, A.A.V., Ouldali, M., Maury, V., Maheu, C., Raux, H., de Haas, F., Roche, S., Gaudin, Y., and Lepault, J. (2010). Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion. *J. Cell Biol.* *191*, 199–210.
- Liu, H., Liu, Y., Liu, S., Pang, D.-W., and Xiao, G. (2011). Clathrin-mediated endocytosis in living host cells visualized through quantum dot labeling of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Virol.* *85*, 6252–6262.
- Lodmell, D.L., Smith, J.S., Esposito, J.J., and Ewalt, L.C. (1995). Cross-protection of mice against a global spectrum of rabies virus variants. *J. Virol.* *69*, 4957–4962.
- Lu, X.-X., Zhu, W.-Y., and Wu, G.-Z. (2018). Rabies virus transmission via solid organs or tissue allotransplantation. *Infect. Dis. Poverty* *7*, 1–8.
- Luo, L.H., Li, Y., Snyder, R.M., and Wagner, R.R. (1988). Point mutations in glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) selected by resistance to neutralization by epitope-specific monoclonal antibodies. *Virology* *163*, 341–348.
- Luo, T.R., Minamoto, N., Hishida, M., Yamamoto, K., Fujise, T., Hiraga, S., Ito, N., Sugiyama, M., and Kinjo, T. (1998). Antigenic and functional analyses of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.* *42*, 187–193.
- Luyet, P.-P., Falguières, T., Pons, V., Pattnaik, A.K., and Gruenberg, J. (2008). The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA. *Traffic Cph. Den.* *9*, 2279–2290.
- Lyles, D.S., Varela, V.A., and Parce, J.W. (1990). Dynamic nature of the quaternary structure of the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* *29*, 2442–2449.
- Maillard, A.P., and Gaudin, Y. (2002). Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *J. Gen. Virol.* *83*, 1465–1476.

- Mansfield, K.L., Johnson, N., and Fooks, A.R. (2004). Identification of a conserved linear epitope at the N terminus of the rabies virus glycoprotein. *J. Gen. Virol.* *85*, 3279–3283.
- Marissen, W.E., Kramer, R.A., Rice, A., Weldon, W.C., Niezgoda, M., Faber, M., Slootstra, J.W., Meloen, R.H., Clijsters-van der Horst, M., Visser, T.J., et al. (2005). Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis. *J. Virol.* *79*, 4672–4678.
- Marsh, M., and Helenius, A. (2006). Virus Entry: Open Sesame. *Cell* *124*, 729–740.
- Masters, P.S., and Banerjee, A.K. (1988). Complex Formation with Vesicular Stomatitis Virus Phosphoprotein NS Prevents Binding of Nucleocapsid Protein N to Nonspecific RNA. *J Virol* *62*, 2658–2654.
- Mathieu, M.E., Grigera, P.R., Helenius, A., and Wagner, R.R. (1996). Folding, Unfolding, and Refolding of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein. *Biochemistry* *35*, 4084–4093.
- Mátrai, J., Chuah, M.K.L., and VandenDriessche, T. (2010). Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *18*, 477–490.
- Mavrakis, M., Iseni, F., Mazza, C., Schoehn, G., Ebel, C., Gentzel, M., Franz, T., and Ruigrok, R.W.H. (2003). Isolation and Characterisation of the Rabies Virus N^o-P Complex Produced in Insect Cells. *Virology* *305*, 406–414.
- Mavrakis, M., McCarthy, A.A., Roche, S., Blondel, D., and Ruigrok, R.W.H. (2004). Structure and Function of the C-terminal Domain of the Polymerase Cofactor of Rabies Virus. *J. Mol. Biol.* *343*, 819–831.
- Mavrakis, M., Méhouas, S., Réal, E., Iseni, F., Blondel, D., Tordo, N., and Ruigrok, R.W.H. (2006). Rabies virus chaperone: Identification of the phosphoprotein peptide that keeps nucleoprotein soluble and free from non-specific RNA. *Virology* *349*, 422–429.
- Mazarakis, N.D., Azzouz, M., Rohll, J.B., Ellard, F.M., Wilkes, F.J., Olsen, A.L., Carter, E.E., Barber, R.D., Baban, D.F., Kingsman, S.M., et al. (2001). Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 2109–2121.
- McGehee, D.S., and Role, L.W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* *57*, 521–546.
- Mebatsion, T. (2001). Extensive Attenuation of Rabies Virus by Simultaneously Modifying the Dynein Light Chain Binding Site in the P Protein and Replacing Arg333 in the G Protein. *J. Virol.* *75*, 11496–11502.
- Mebatsion, T., König, M., and Conzelmann, K.-K. (1996). Budding of Rabies Virus Particles in the Absence of the Spike Glycoprotein. *Cell* *84*, 941–951.
- Mebatsion, T., Weiland, F., and Conzelmann, K.-K. (1999). Matrix Protein of Rabies Virus Is Responsible for the Assembly and Budding of Bullet-Shaped Particles and Interacts with the Transmembrane Spike Glycoprotein G. *J Virol* *73*, 242–250.
- Mire, C.E., White, J.M., and Whitt, M.A. (2010). A Spatio-Temporal Analysis of Matrix Protein and Nucleocapsid Trafficking during Vesicular Stomatitis Virus Uncoating. *PLoS Pathog.* *6*, 1–15.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 6986–6991.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, *427*, 313–319.
- Money, V.A., McPhee, H.K., Mosely, J.A., Sanderson, J.M., and Yeo, R.P. (2009). Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 4441–4446.
- Morin, B., Liang, B., Gardner, E., Ross, R.A., and Whelan, S.P.J. (2017). An *In Vitro* RNA Synthesis Assay for Rabies Virus Defines Ribonucleoprotein Interactions Critical for Polymerase Activity. *J. Virol.* *91*, 1–11.
- Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N.J., and Robinson, M.S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* *162*, 909–918.

- Müller, T., Dietzschold, B., Ertl, H., Fooks, A.R., Freuling, C., Fehlner-Gardiner, C., Kliemt, J., Meslin, F.X., Franka, R., Rupprecht, C.E., et al. (2009). Development of a mouse monoclonal antibody cocktail for post-exposure rabies prophylaxis in humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, 1–10.
- Munis, A.M., Tijani, M., Hassall, M., Mattiuzzo, G., Collins, M.K., and Takeuchi, Y. (2018). Characterization of Antibody Interactions with the G Protein of Vesicular Stomatitis Virus Indiana Strain and Other Vesiculovirus G Proteins. *J. Virol.* 92, 1–14.
- Murphy, F.A., and Bauer, S.P. (1974). Early Street Rabies Virus Infection in Striated Muscle and Later Progression to the Central Nervous System. *Intervirology* 3, 256–268.
- Nakagawa, K., Kobayashi, Y., Ito, N., Suzuki, Y., Okada, K., Makino, M., Goto, H., Takahashi, T., and Sugiyama, M. (2017). Molecular Function Analysis of Rabies Virus RNA Polymerase L Protein by Using an L Gene-Deficient Virus. *J. Virol.* 91, 1–16.
- Naldini, L., Blömer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267.
- Neumann, P., Lieber, D., Meyer, S., Dautel, P., Kerth, A., Kraus, I., Garten, W., and Stubbs, M.T. (2009). Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein (BDV-M) reveals ssRNA binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3710–3715.
- Newcomb, W.W., Tobin, G.J., McGowan, J.J., and Brown, J.C. (1982). In vitro reassembly of vesicular stomatitis virus skeletons. *J. Virol.* 41, 1055–1062.
- Ni, Y., Tominaga, Y., Honda, Y., Morimoto, K., Sakamoto, S., and Kawai, A. (1995). Mapping and Characterization of a Sequential Epitope on the Rabies Virus Glycoprotein Which Is Recognized by a Neutralizing Monoclonal Antibody, RG719. *Microbiol. Immunol.* 39, 693–702.
- Nikolic, J., Civas, A., Lama, Z., Lagaudrière-Gesbert, C., and Blondel, D. (2016). Rabies Virus Infection Induces the Formation of Stress Granules Closely Connected to the Viral Factories. *PLOS Pathog.* 12, 1–27.
- Nikolic, J., Bars, R.L., Lama, Z., Scrima, N., Lagaudrière-Gesbert, C., Gaudin, Y., and Blondel, D. (2017). Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles. *Nat. Commun.* 8, 1–13.
- Nikolic, J., Belot, L., Raux, H., Legrand, P., Gaudin, Y., and Albertini, A. (2018). Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nat. Commun.* 9, 1–12.
- Nishimura, H., Hara, M., Sugawara, K., Kitame, F., Takiguchi, K., Umetsu, Y., Tonosaki, A., and Nakamura, K. (1990). Characterization of the cord-like structures emerging from the surface of influenza C virus-infected cells. *Virology* 179, 179–188.
- Obiang, L., Raux, H., Ouldali, M., Blondel, D., and Gaudin, Y. (2012). Phenotypes of vesicular stomatitis virus mutants with mutations in the PSAP motif of the matrix protein. *J. Gen. Virol.* 93, 857–865.
- Odell, D., Wanas, E., Yan, J., and Ghosh, H.P. (1997). Influence of membrane anchoring and cytoplasmic domains on the fusogenic activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *J. Virol.* 71, 7996–8000.
- Ogino, T., and Banerjee, A.K. (2007). Unconventional Mechanism of mRNA Capping by the RNA-Dependent RNA Polymerase of Vesicular Stomatitis Virus. *Mol. Cell* 25, 85–97.
- Ogino, T., and Banerjee, A.K. (2011). An unconventional pathway of mRNA cap formation by vesiculoviruses. *Virus Res.* 162, 100–109.
- Ogino, T., and Green, J.T. (2019). Transcriptional Control and mRNA Capping by the GDP Polyribonucleotidyltransferase Domain of the Rabies Virus Large Protein. *Viruses* 11, 1–20.
- Ogino, M., Gupta, N., Green, T.J., and Ogino, T. (2018). A dual-functional priming-capping loop of rhabdoviral RNA polymerases directs terminal de novo initiation and capping intermediate formation. *Nucleic Acids Res.* 47, 299–309.
- Ohishi, H., Shigemoto, R., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1993). Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 53, 1009–1018.

- Pak, C.C., Puri, A., and Blumenthal, R. (1997). Conformational Changes and Fusion Activity of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein: [125I]Iodonaphthyl Azide Photolabeling Studies in Biological Membranes. *Biochemistry* 36, 8890–8896.
- Pasqual, G., Rojek, J.M., Masin, M., Chatton, J.-Y., and Kunz, S. (2011). Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport. *PLoS Pathog.* 7, 1–19.
- Pavitrakar, D.V., Damle, R.G., Tripathy, A.S., and Shil, P. (2018). Identification of a conserved neutralizing epitope in the G-protein of Chandipura virus. *Arch. Virol.* 163, 3215–3223.
- Peluso, R.W., and Moyer, S.A. (1988). Viral proteins required for the in Vitro replication of vesicular stomatitis virus defective interfering particle genome RNA. *Virology* 162, 369–376.
- Piccinotti, S., and Whelan, S.P.J. (2016). Rabies Internalizes into Primary Peripheral Neurons via Clathrin Coated Pits and Requires Fusion at the Cell Body. *PLoS Pathog.* 12, 1–25.
- Piccinotti, S., Kirchhausen, T., and Whelan, S.P.J. (2013). Uptake of Rabies Virus into Epithelial Cells by Clathrin-Mediated Endocytosis Depends upon Actin. *J. Virol.* 87, 11637–11647.
- Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L., and Tordo, N. (1990). Sequence Comparison of Five Polymerases (L proteins) of Unsegmented Negative-strand RNA Viruses: Theoretical Assignment of Functional Domains. *J. Gen. Virol.* 71, 1153–1162.
- Poisson, N., Gaudin, Y., Jacob, Y., Vaney, M.-C., Tordo, N., Blondel, D., King, S., and Real, E. (2001). Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J. Gen. Virol.* 82, 2691–2696.
- Prehaud, C., Coulon, P., Lafay, F., Thiers, C., and Flamand, A. (1988). Antigenic Site II of the Rabies Virus Glycoprotein: Structure and Role in Viral Virulence. *J Virol* 62, 1–7.
- Préhaud, C., Wolff, N., Terrien, E., Lafage, M., Mégret, F., Babault, N., Cordier, F., Tan, G.S., Maitrepierre, E., Ménager, P., et al. (2010). Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci. Signal.* 3, ra5.
- Puri, A., Winick, J., Lowy, R.J., Covell, D., Eidelman, O., Walter, A., and Blumenthal, R. (1988). Activation of vesicular stomatitis virus fusion with cells by pretreatment at low pH. *J. Biol. Chem.* 263, 4749–4753.
- Puri, A., Grimaldi, S., and Blumenthal, R. (1992). Role of viral envelope sialic acid in membrane fusion mediated by the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* 31, 10108–10113.
- Rainsford, E.W., Harouaka, D., and Wertz, G.W. (2010). Importance of Hydrogen Bond Contacts between the N Protein and RNA Genome of Vesicular Stomatitis Virus in Encapsidation and RNA Synthesis. *J. Virol.* 84, 1741–1751.
- Raux, H., Coulon, P., Lafay, F., and Flamand, A. (1995). Monoclonal antibodies which recognize the acidic configuration of the rabies glycoprotein at the surface of the virion can be neutralizing. *Virology* 210, 400–408.
- Raux, H., Flamand, A., and Blondel, D. (2000). Interaction of the Rabies Virus P Protein with the LC8 Dynein Light Chain. *J. Virol.* 74, 10212–10216.
- Raux, H., Obiang, L., Richard, N., Harper, F., Blondel, D., and Gaudin, Y. (2010). The Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus Binds Dynamin for Efficient Viral Assembly. *J. Virol.* 84, 12609–12618.
- Redondo, N., Madan, V., Alvarez, E., and Carrasco, L. (2015). Impact of Vesicular Stomatitis Virus M Proteins on Different Cellular Functions. *PLOS ONE* 10, 1–22.
- Reiter, R.E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M.M., et al. (1998). Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1735–1740.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375, 291–298.

- Ribeiro, E. de A., Leyrat, C., Gérard, F.C.A., Albertini, A.A.V., Falk, C., Ruigrok, R.W.H., and Jamin, M. (2009). Binding of Rabies Virus Polymerase Cofactor to Recombinant Circular Nucleoprotein–RNA Complexes. *J. Mol. Biol.* *394*, 558–575.
- Ribeiro, E.A., Favier, A., Gerard, F.C.A., Leyrat, C., Brutscher, B., Blondel, D., Ruigrok, R.W.H., Blackledge, M., and Jamin, M. (2008). Solution Structure of the C-Terminal Nucleoprotein–RNA Binding Domain of the Vesicular Stomatitis Virus Phosphoprotein. *J. Mol. Biol.* *382*, 525–538.
- Richardson, J.C., and Peluso, R.W. (1996). Inhibition of VSV Genome RNA Replication but Not Transcription by Monoclonal Antibodies Specific for the Viral P Protein. *Virology* *216*, 26–34.
- Rieder, M., and Conzelmann, K.-K. (2011). Interferon in Rabies Virus Infection. In *Advances in Virus Research*, pp. 91–114.
- Rieder, M., Brzozka, K., Pfaller, C.K., Cox, J.H., Stitz, L., and Conzelmann, K.-K. (2011). Genetic Dissection of Interferon-Antagonistic Functions of Rabies Virus Phosphoprotein: Inhibition of Interferon Regulatory Factor 3 Activation Is Important for Pathogenicity. *J. Virol.* *85*, 842–852.
- Roche, S. (2006). Crystal Structure of the Low-pH Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* *313*, 187–191.
- Roche, S., and Gaudin, Y. (2002). Characterization of the Equilibrium between the Native and Fusion-Inactive Conformation of Rabies Virus Glycoprotein Indicates That the Fusion Complex Is Made of Several Trimers. *Virology* *297*, 128–135.
- Roche, S., and Gaudin, Y. (2004). Evidence that rabies virus forms different kinds of fusion machines with different pH thresholds for fusion. *J. Virol.* *78*, 8746–8752.
- Roche, S., Rey, F.A., Gaudin, Y., and Bressanelli, S. (2007). Structure of the Prefusion Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* *315*, 843–848.
- Roche, S., Albertini, A.A.V., Lepault, J., Bressanelli, S., and Gaudin, Y. (2008). Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 1716–1728.
- Rose, J.K., Adams, G.A., and Gallione, C.J. (1984). The presence of cysteine in the cytoplasmic domain of the vesicular stomatitis virus glycoprotein is required for palmitate addition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 2050–2054.
- Roth, S.L., and Whittaker, G.R. (2011). Promotion of vesicular stomatitis virus fusion by the endosome-specific phospholipid bis(monoacylglycero)phosphate (BMP). *FEBS Lett.* *585*, 865–869.
- Rubinstein, M. (2018). Is Lgr4 essential for VSV- and VSV-G-pseudotyped lentiviral vector entry to cells? *J. Biol. Chem.* *293*, 112–112.
- Rudenko, G. (2002). Structure of the LDL Receptor Extracellular Domain at Endosomal pH. *Science* *298*, 2353–2358.
- Ruigrok, R.W., Crépin, T., and Kolakofsky, D. (2011). Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Host—Microbe Interact. Fungiparasitesviruses* *14*, 504–510.
- Ruigrok, R.W.H., Schoehn, G., Dessen, A., Forest, E., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H.-D., and Weissenhorn, W. (2000). Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of ebola virus. *J. Mol. Biol.* *300*, 103–112.
- Rupprecht, C.E., Turmelle, A., and Kuzmin, I.V. (2011). A perspective on lyssavirus emergence and perpetuation. *Curr. Opin. Virol.* *1*, 662–670.
- Sauter, N. K., Hanson, J. E., Glick, G. D., Brown, J. H., Crowther, R. L., Park, S. J., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1992). Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. *Biochemistry*, *31*, 9609–9621.
- Sanchez-San Martin, C., Liu, C. Y., & Kielian, M. (2009). Dealing with low pH: entry and exit of alphaviruses and flaviviruses. *Trends in Microbiology*, *17*, 514–521.
- Schlegel, R., Tralka, T.S., Willingham, M.C., and Pastan, I. (1983). Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: Is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* *32*, 639–646.

- Schnell, M.J. (1998). Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *EMBO J.* *17*, 1289–1296.
- Schnell, M.J., and Conzelmann, K.-K. (1995). Polymerase Activity of in Vitro Mutated Rabies Virus L Protein. *Virology* *214*, 522–530.
- Schnell, M.J., Mebatsion, T., and Conzelmann, K.K. (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* *13*, 4195–4203.
- Schoehn, G., Iseni, F., Mavrikakis, M., Blondel, D., and Ruigrok, R.W.H. (2001). Structure of Recombinant Rabies Virus Nucleoprotein-RNA Complex and Identification of the Phosphoprotein Binding site. *J. Virol.* *75*, 490–498.
- Seif, I., Coulon, P., Rollin, P.E., and Flamand, A. (1985). Rabies virulence: Effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* *53*, 926–934.
- Shao, L., Zhao, J., and Zhang, H. (2016). Spring viraemia of carp virus enters grass carp ovary cells via clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis. *J. Gen. Virol.* *97*, 2824–2836.
- Shiple, R., Wright, E., Selden, D., Wu, G., Aegerter, J., Fooks, A.R., and Banyard, A.C. (2019). Bats and Viruses: Emergence of Novel Lyssaviruses and Association of Bats with Viral Zoonoses in the EU. *Trop. Med. Infect. Dis.* *4*, 1–22.
- Shulman, A., Katz, M., Cohen-Dvashi, H., Greenblatt, H.M., Levy, Y., Diskin, R. (2019). Variations in Core Packing of GP2 from Old World Mammarenaviruses in their Post-Fusion Conformations Affect Membrane-Fusion Efficiencies, *Journal of Molecular Biology*, *432*, 2095-2111.
- Si, Z., Zhang, J., Shivakoti, S., Atanasov, I., Tao, C.-L., Hui, W.H., Zhou, K., Yu, X., Li, W., Luo, M., et al. (2018). Different functional states of fusion protein gB revealed on human cytomegalovirus by cryo electron tomography with Volta phase plate. *PLOS Pathog.* *14*, 1–24.
- Sieczkarski, S.B., and Whittaker, G.R. (2003). Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic Cph. Den.* *4*, 333–343.
- Sinibaldi, L., Goldoni, P., Seganti, L., Superti, F., Tsiang, H., and Orsi, N. (1985). Gangliosides in early interactions between vesicular stomatitis virus and CER cells. *Microbiologica* *8*, 355–365.
- Skehel, J.J., Wiley, D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 531–569.
- Snijder, J., Borst, A.J., Dosey, A., Walls, A.C., Burrell, A., Reddy, V.S., Kollman, J.M., and Veasler, D. (2017). Vitrification after multiple rounds of sample application and blotting improves particle density on cryo-electron microscopy grids. *J. Struct. Biol.* *198*, 38–42.
- Solon, J. (2005). Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system. *J. Gen. Virol.* *86*, 3357–3363.
- Stanifer, M.L., Cureton, D.K., and Whelan, S.P.J. (2011). A recombinant vesicular stomatitis virus bearing a lethal mutation in the glycoprotein gene uncovers a second site suppressor that restores fusion. *J. Virol.* *85*, 8105–8115.
- Stegmann, T., Booy, F.P., and Wilschut, J. (1987). Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* *262*, 17744–17749.
- Steitz, T.A. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature* *391*, 231–232.
- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D., & Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO Journal*, *11*, 2407–2414.
- Stillman, E.A., and Whitt, M.A. (1999). Transcript Initiation and 5'-End Modifications Are Separable Events during Vesicular Stomatitis Virus Transcription. *J Virol* *73*, 7199–7209.
- Sun, T., Yin, W.-L., Fang, B.-H., Wang, Q., Liang, C.-Z., and Yue, Z.-Q. (2017). Prediction of G gene epitopes of viral hemorrhagic septicemia virus and eukaryotic expression of major antigen determinant sequence. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* *63*, 84–88.

- Sun, X., Yau, V.K., Briggs, B.J., and Whittaker, G.R. (2005). Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338, 53–60.
- Sun, X., Belouzard, S., and Whittaker, G.R. (2008). Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein. *J. Biol. Chem.* 283, 6418–6427.
- Supekar, V. M., Bruckmann, C., Ingallinella, P., Bianchi, E., Pessi, A., & Carfi, A. (2004). Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 17958–17963.
- Superti, F., Seganti, L., Tsiang, H., and Orsi, N. (1984). Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to CER cells. *Arch. Virol.* 81, 321–328.
- Superti, F., Hauttecoeur, B., Morelec, M.-J., Goldoni, P., Bizzini, B., and Tsiang, H. (1986). Involvement of Gangliosides in Rabies Virus Infection. *J. Gen. Virol.* 67, 47–56.
- Superti, F., Seganti, L., Ruggeri, F.M., Tinari, A., Donelli, G., and Orsi, N. (1987). Entry Pathway of Vesicular Stomatitis Virus into Different Host Cells. *J. Gen. Virol.* 68, 387–399.
- Takayama-Ito, M., Ito, N., Yamada, K., Sugiyama, M., and Minamoto, N. (2006). Multiple amino acids in the glycoprotein of rabies virus are responsible for pathogenicity in adult mice. *Virus Res.* 115, 169–175.
- Tan, G.S., Preuss, M.A.R., Williams, J.C., and Schnell, M.J. (2007). The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7229–7234.
- Tao, L., Ge, J., Wang, X., Zhai, H., Hua, T., Zhao, B., Kong, D., Yang, C., Chen, H., and Bu, Z. (2010). Molecular basis of neurovirulence of flury rabies virus vaccine strains: importance of the polymerase and the glycoprotein R333Q mutation. *J. Virol.* 84, 8926–8936.
- Taylor, G.M., Hanson, P.I., and Kielian, M. (2007). Ubiquitin Depletion and Dominant-Negative VPS4 Inhibit Rhabdovirus Budding without Affecting Alphavirus Budding. *J. Virol.* 81, 13631–13639.
- Testa, D. (1980). Unique mode of transcription in vitro by vesicular stomatitis virus. *Cell* Vol.21, p267-275.
- Thoulouze, M.-I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H., and Lafon, M. (1998). The Neural Cell Adhesion Molecule Is a Receptor for Rabies Virus. *J Virol* 72, 7181–7190.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G., and Rougeon, F. (1986a). Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 3914–3918.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., and Keith, G. (1986b). Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Res.* 14, 2671–2683.
- Tsekoa, T.L., Lotter-Stark, T., Buthelezi, S., Chakauya, E., Stoychev, S.H., Sabeta, C., Shumba, W., Phahladira, B., Hume, S., Morton, J., et al. (2016). Efficient In Vitro and In Vivo Activity of Glyco-Engineered Plant-Produced Rabies Monoclonal Antibodies E559 and 62-71-3. *PLoS One* 11, 1–15.
- Tsiang, H. (1979). Evidence for an Intraaxonal Transport of Fixed and Street Rabies Virus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 38, 286–296.
- Tuffereau, C. (1998). Low-affinity nerve-growth factor receptor (p75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 17, 7250–7259.
- Tuffereau, C., Leblois, H., Bénéjean, J., Coulon, P., Lafay, F., and Flamand, A. (1989). Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* 172, 206–212.
- Tuffereau, C., Bénéjean, J., Flamand, A., Tordo, N., Desmézières, E., Perrin, P., and Jallet, C. (2001). Interaction of lyssaviruses with the low-affinity nerve-growth factor receptor p75NTR. *J. Gen. Virol.* 82, 2861–2867.
- Tuffereau, C., Schmidt, K., Langevin, C., Lafay, F., Dechant, G., and Koltzenburg, M. (2007). The Rabies Virus Glycoprotein Receptor p75NTR Is Not Essential for Rabies Virus Infection. *J. Virol.* 81, 13622–13630.
- Vandepol, S.B., Lefrancois, L., and Holland, J.J. (1986). Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* 148, 312–325.
- Varble, A.J., Ried, C.D., Hammond, W.J., Marquis, K.A., Woodruff, M.C., and Ferran, M.C. (2016). The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits NF- κ B activation in mouse L929 cells. *Virology* 499, 99–104.

- Verdaguer, N., Fita, I., Reithmayer, M., Moser, R., and Blaas, D. (2004). X-ray structure of a minor group human rhinovirus bound to a fragment of its cellular receptor protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 429–434.
- Vidy, A., Chelbi-Alix, M., and Blondel, D. (2005). Rabies Virus P Protein Interacts with STAT1 and Inhibits Interferon Signal Transduction Pathways. *J. Virol.* *79*, 14411–14420.
- Von Kobbe, C., Van Deursen, J.M.A., Rodrigues, J.P., Sitterlin, D., Bachi, A., Wu, X., Wilm, M., Carmo-Fonseca, M., and Izaurralde, E. (2000). Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Inhibits Host Cell Gene Expression by Targeting the Nucleoporin Nup98. *Mol. Cell* *6*, 1243–1252.
- Voss, J., Vaney, M., Duquerroy, S. et al. (2010). Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* *468*, 709–712.
- Wahlberg, J. M., Boere, W. A., & Garoff, H. (1989). The heterodimeric association between the membrane proteins of Semliki Forest virus changes its sensitivity to low pH during virus maturation. *Journal of Virology*, *63*, 4991–4997.
- Walker, P.J., Firth, C., Widen, S.G., Blasdel, K.R., Guzman, H., Wood, T.G., Paradkar, P.N., Holmes, E.C., Tesh, R.B., and Vasilakis, N. (2015). Evolution of Genome Size and Complexity in the Rhabdoviridae. *PLOS Pathog.* *11*, 1–25.
- Walker, P.J., Blasdel, K.R., Calisher, C.H., Dietzgen, R.G., Kondo, H., Kurath, G., Longdon, B., Stone, D.M., Tesh, R.B., Tordo, N., et al. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae. *J. Gen. Virol.* *99*, 447–448.
- Walls, A.C., Xiong, X., Park, Y.-J., Tortorici, M.A., Snijder, J., Quispe, J., Cameroni, E., Gopal, R., Dai, M., Lanzavecchia, A., et al. (2019). Unexpected Receptor Functional Mimicry Elucidates Activation of Coronavirus Fusion. *Cell* *176*, 1026–1039.
- Wang, J., Wang, Z., Liu, R., Shuai, L., Wang, X., Luo, J., Wang, C., Chen, W., Wang, X., Ge, J., et al. (2018). Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus. *PLOS Pathog.* *14*, 1–21.
- Warrell, D.A. (1976). The clinical picture of rabies in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *70*, 188–195.
- Weekes, M.P., Antrobus, R., Talbot, S., Hör, S., Simecek, N., Smith, D.L., Bloor, S., Randow, F., and Lehner, P.J. (2012). Proteomic plasma membrane profiling reveals an essential role for gp96 in the cell surface expression of LDLR family members, including the LDL receptor and LRP6. *J. Proteome Res.* *11*, 1475–1484.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, *387*, 426–430.
- Weissenhorn, W., Carfi, A., Lee, K. H., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1998). Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Molecular Cell*, *2*, 605–616.
- Whitlow, Z.W., Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2006). Preferential Translation of Vesicular Stomatitis Virus mRNAs Is Conferred by Transcription from the Viral Genome. *J. Virol.* *80*, 11733–11742.
- Whitlow, Z.W., Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2008). New mRNAs Are Preferentially Translated during Vesicular Stomatitis Virus Infection. *J. Virol.* *82*, 2286–2294.
- Wilson, I. A., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution. *Nature*, *289*, 366–373.
- Wimley, W.C., and White, S.H. (1992). Partitioning of tryptophan side-chain analogs between water and cyclohexane. *Biochemistry* *31*, 12813–12818.
- Wu, X., Gong, X., Foley, H.D., Schnell, M.J., and Fu, Z.F. (2002). Both Viral Transcription and Replication Are Reduced when the Rabies Virus Nucleoprotein Is Not Phosphorylated. *J. Virol.* *76*, 4153–4161.
- Xu, Y., Liu, Y., Lou, Z., Qin, L., Li, X., Bai, Z., Pang, H., Tien, P., Gao, G. F., & Rao, Z. (2004). Structural basis for coronavirus-mediated membrane fusion: Crystal structure of mouse hepatitis virus spike protein fusion core. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 30514–30522.
- Xu, L.-M., Liu, M., Zhao, J.-Z., Cao, Y.-S., Yin, J.-S., Liu, H.-B., and Lu, T. (2014). Epitope mapping of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein by flow cytometry. *Biotechnol. Lett.* *36*, 2109–2116.
- Yamada, S., and Ohnishi, S. (1986). Vesicular stomatitis virus binds and fuses with phospholipid domain in target cell membranes. *Biochemistry* *25*, 3703–3708.

- Yamamoto, S., Fukuhara, T., Ono, C., Uemura, K., Kawachi, Y., Shiokawa, M., Mori, H., Wada, M., Shima, R., Okamoto, T., et al. (2016). Lipoprotein Receptors Redundantly Participate in Entry of Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog.* 12, 1–24.
- Yang, J., Koprowski, H., Dietzschold, B., and Fu, Z.F. (1999). Phosphorylation of Rabies Virus Nucleoprotein Regulates Viral RNA Transcription and Replication by Modulating Leader RNA Encapsidation. *J Virol* 73, 1661–1664.
- Yang, L., Ding, L., and Huang, H.W. (2003). New phases of phospholipids and implications to the membrane fusion problem. *Biochemistry* 42, 6631–6635.
- Yin, H. S., Paterson, R. G., Wen, X., Lamb, R. A., & Jardetzky, T. S. (2005). Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 9288–9293.
- Yin, H. S., Wen, X., Paterson, R. G., Lamb, R. A., & Jardetzky, T. S. (2006). Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*, 439, 38–44.
- Yousaf, M.Z., Qasim, M., Zia, S., Khan, M. ur R., Ashfaq, U.A., and Khan, S. (2012). Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. *Virol. J.* 9, 1–5.
- Zagouras, P., Ruusala, A., and Rose, J.K. (1991). Dissociation and reassociation of oligomeric viral glycoprotein subunits in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 65, 1976–1984.
- Zaitseva, E., Mittal, A., Griffin, D.E., and Chernomordik, L.V. (2005). Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins. *J. Cell Biol.* 169, 167–177.
- Zan, J., Liu, J., Zhou, J.-W., Wang, H.-L., Mo, K.-K., Yan, Y., Xu, Y.-B., Liao, M., Su, S., Hu, R.-L., et al. (2016). Rabies virus matrix protein induces apoptosis by targeting mitochondria. *Exp. Cell Res.* 347, 83–94.
- Zhang, N., Huang, H., Tan, B., Wei, Y., Xiong, Q., Yan, Y., Hou, L., Wu, N., Siwko, S., Cimorelli, A., et al. (2017). Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 facilitates vesicular stomatitis virus infection by binding vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 292, 16527–16538.
- Zhang X., Wang C., Chen B., Wang Q., Xu W., Ye S., Jiang S., Zhu Y., Zhang R. (2019). Crystal structure of refolding fusion core of lassa virus GP2 and design of lassa virus fusion inhibitors. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-12.
- Zeev-Ben-Mordehai, T., Vasishtan, D., Durán, A.H, Vollmer, B., White, P., Pandurangan, C., Siebert, A., Topf, M., Grünewald, K. (2016). Novel conformation of herpesvirus glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (15), 4176-4181.

ANNEXES

Images de microscopie électronique

Les images présentées dans les figures de la partie Résultats sont jointes ci-après pour permettre une meilleure visualisation.

Figure 38 A (pH 8)

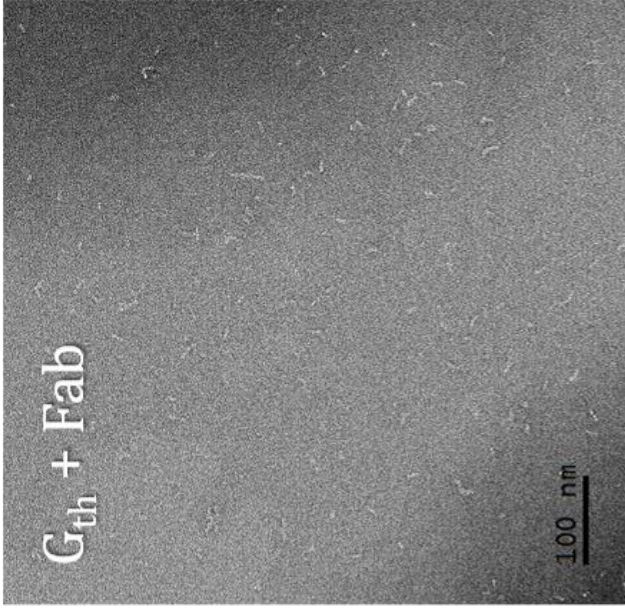
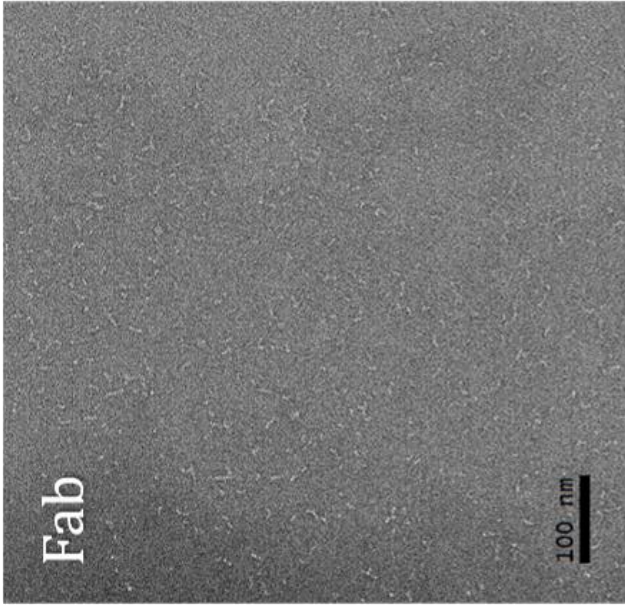
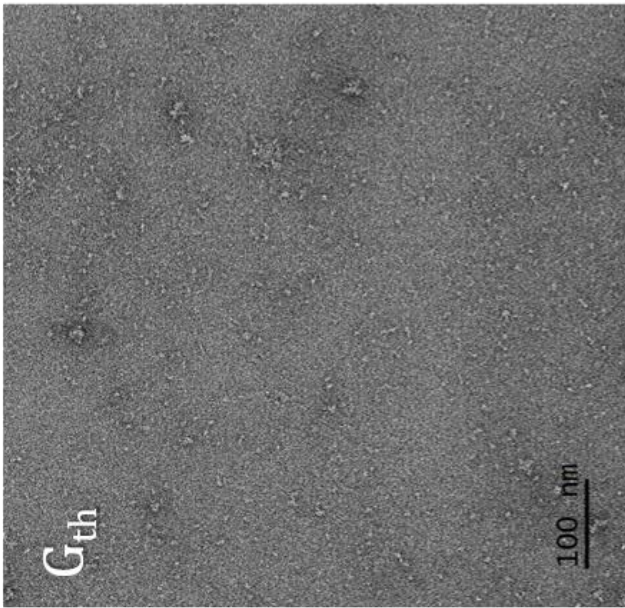
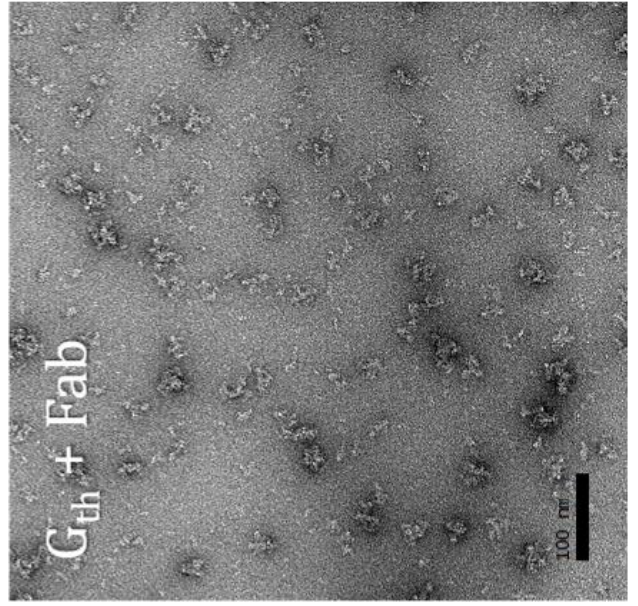
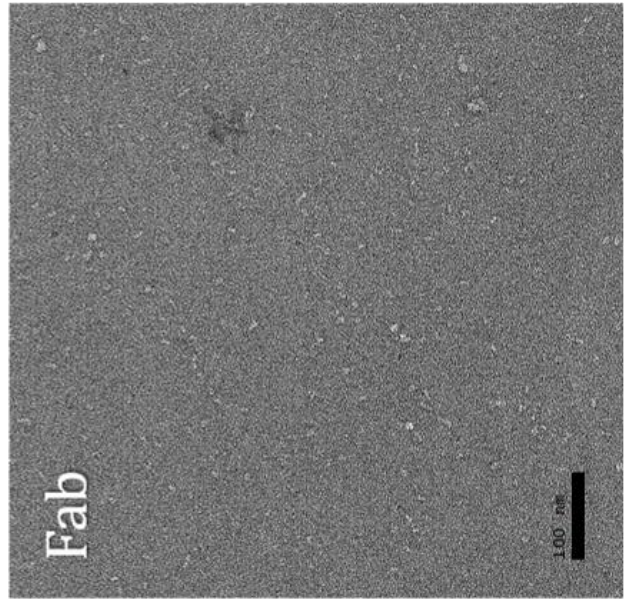
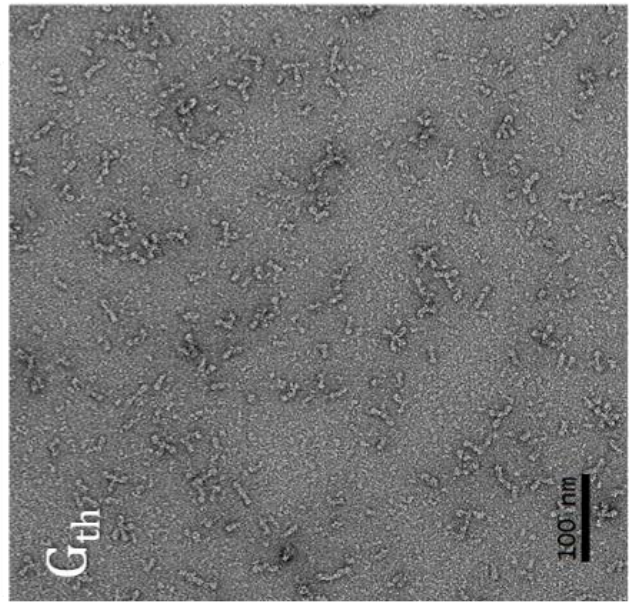


Figure 38 B (pH 6)



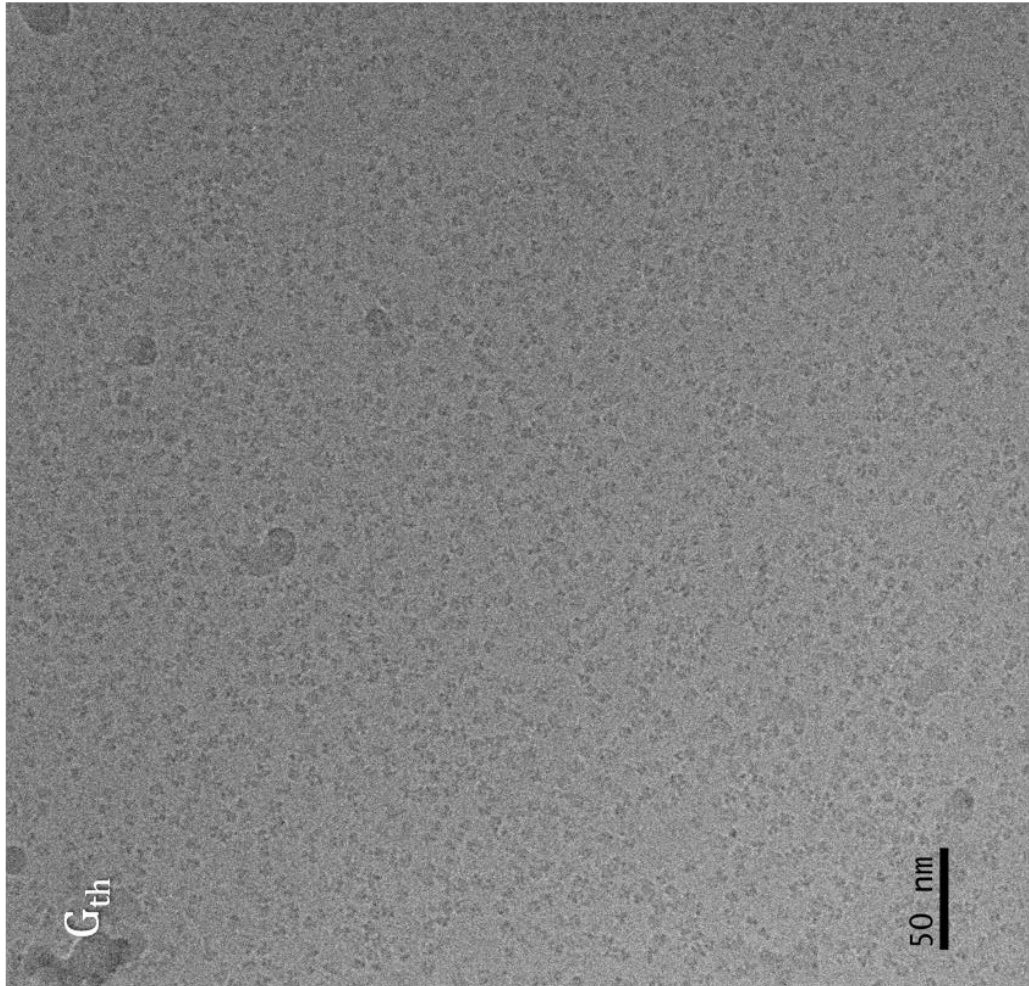
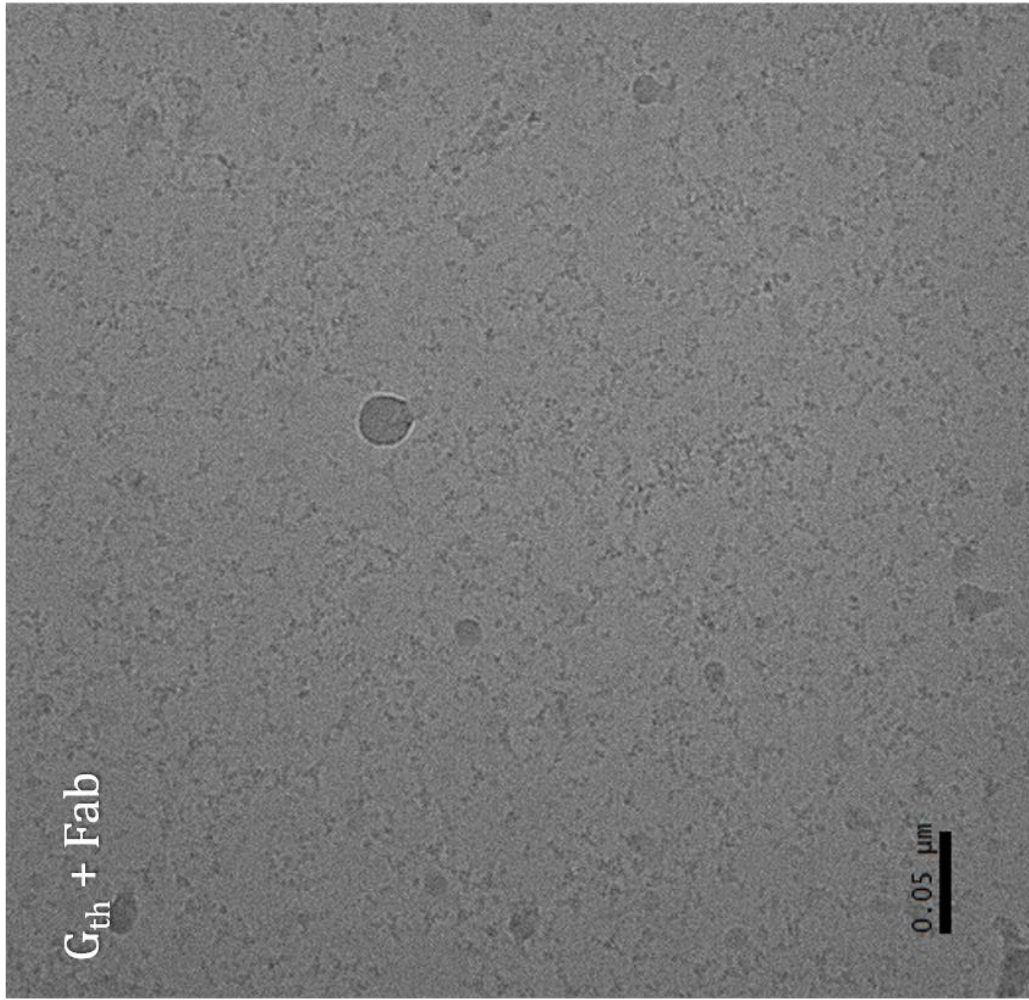


Figure 39

Figure 43

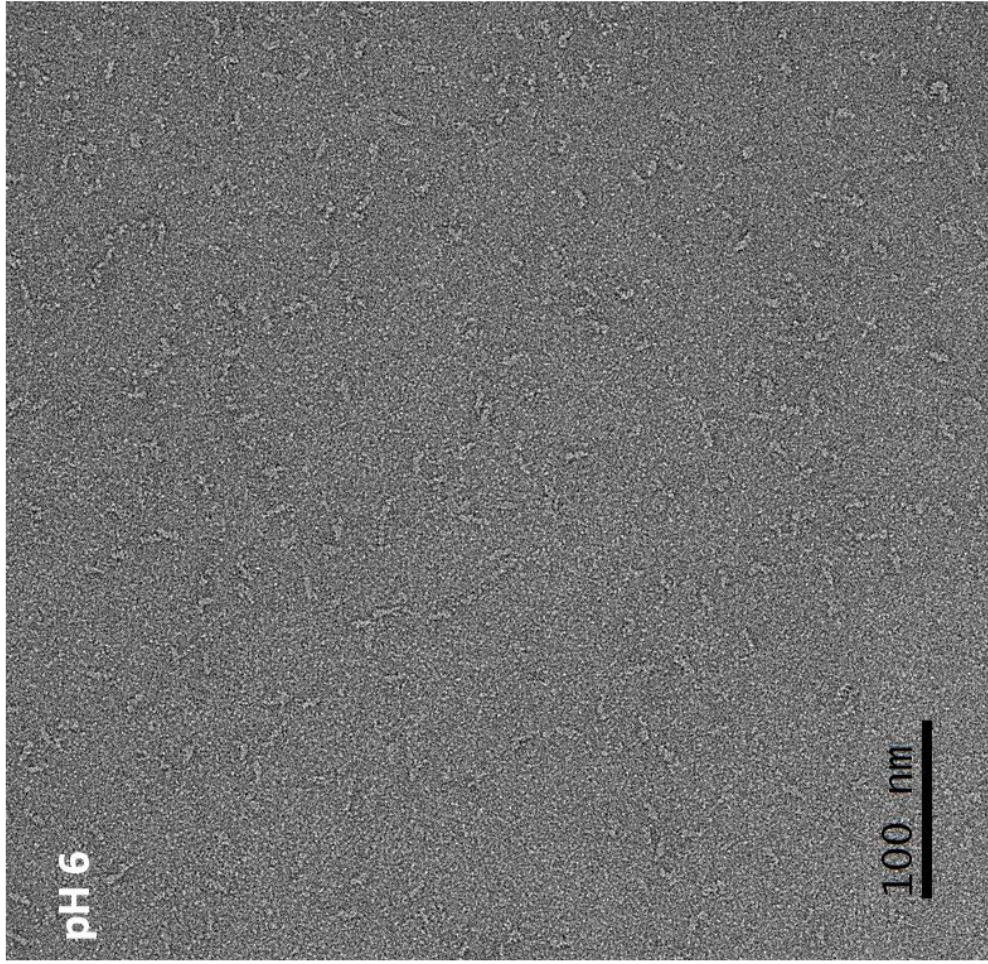
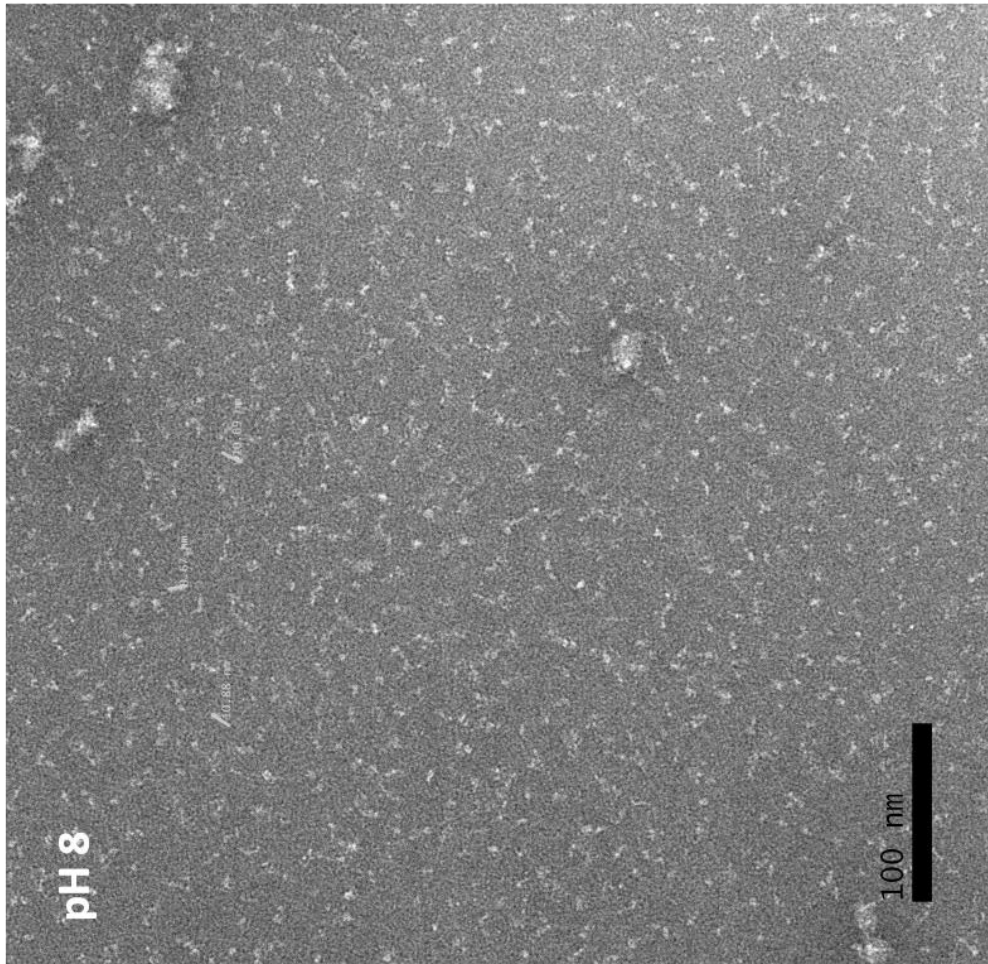


Figure 46

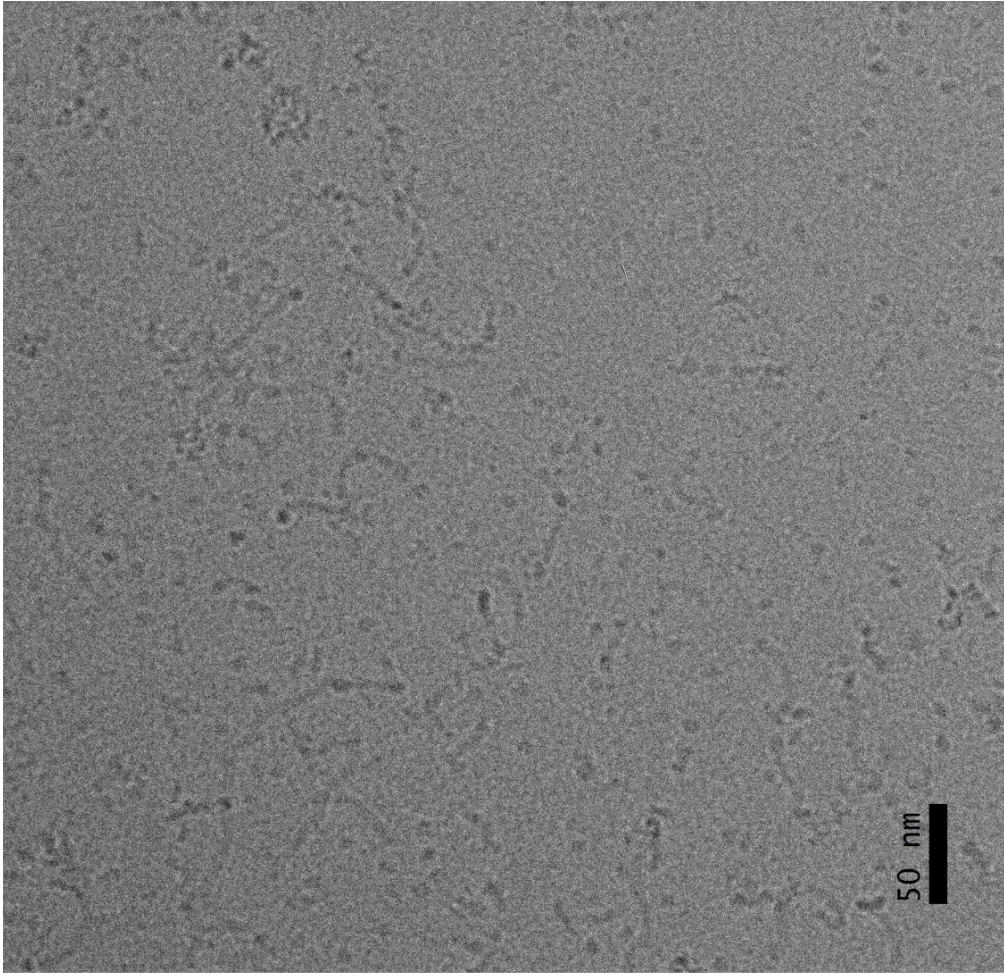


Figure 45

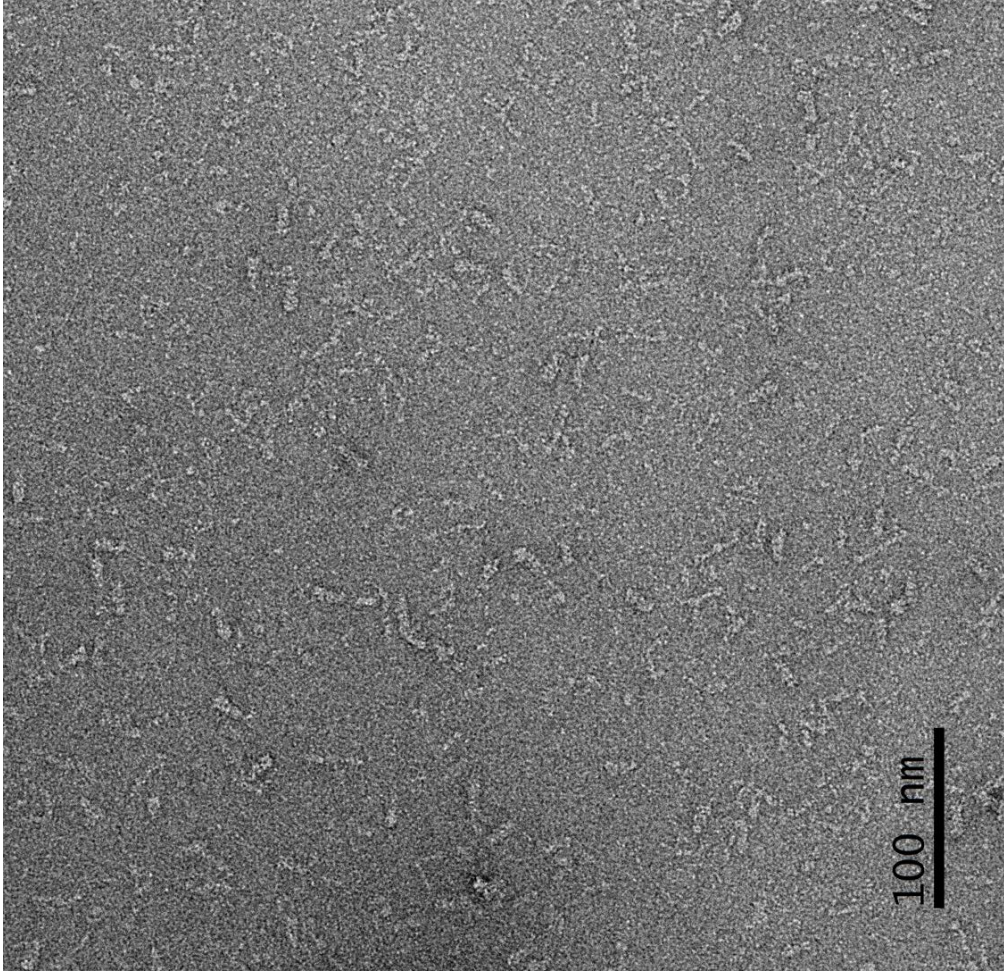


Figure 49

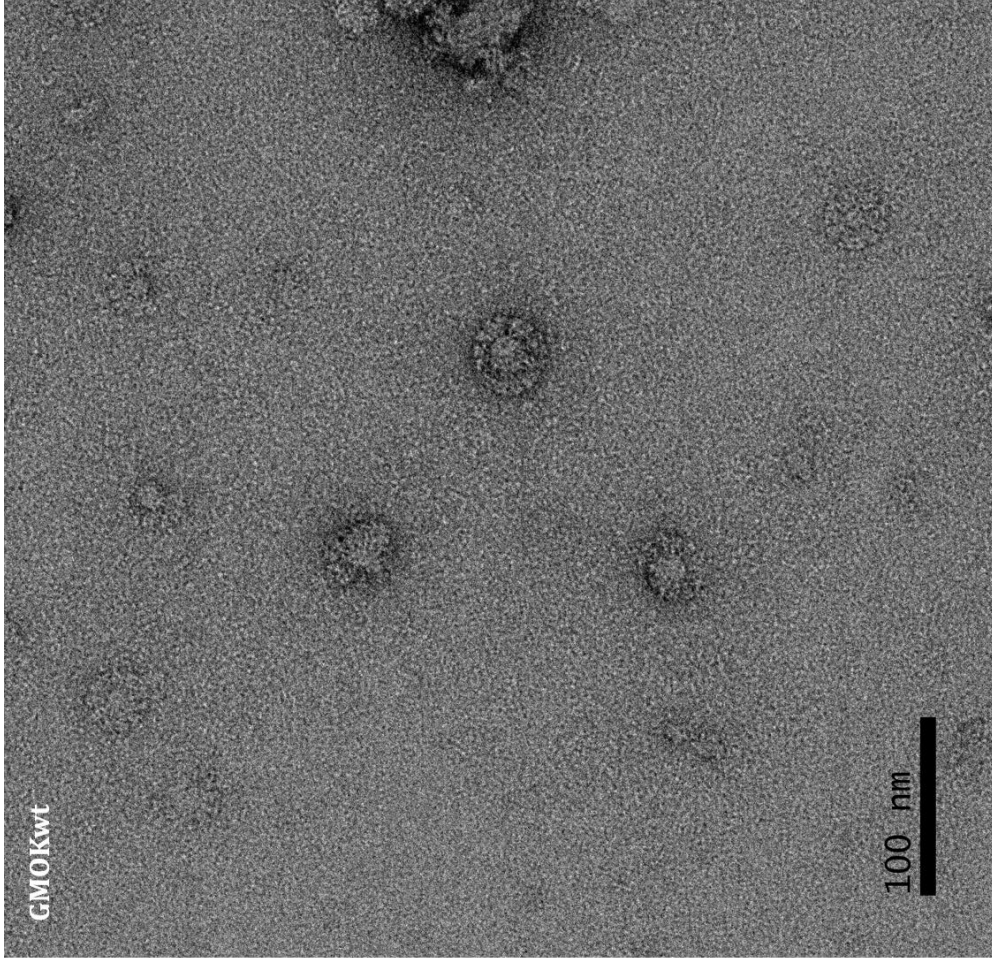
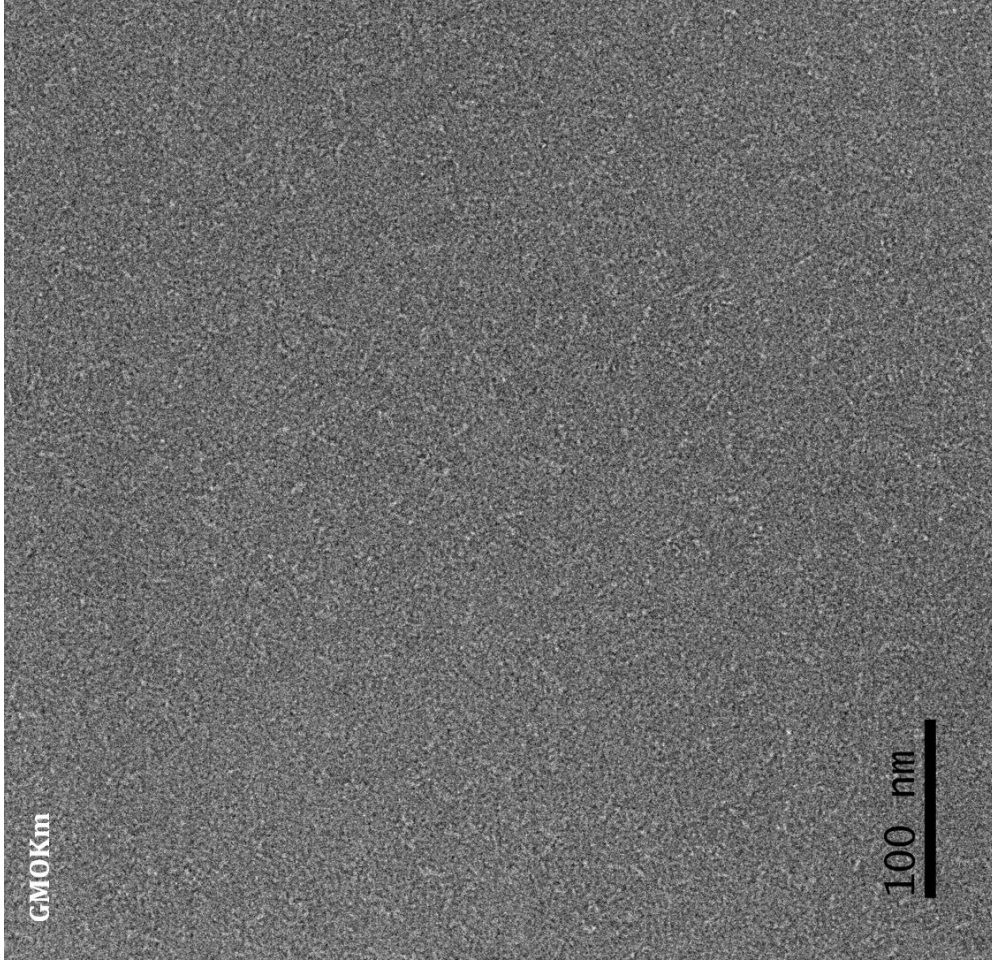
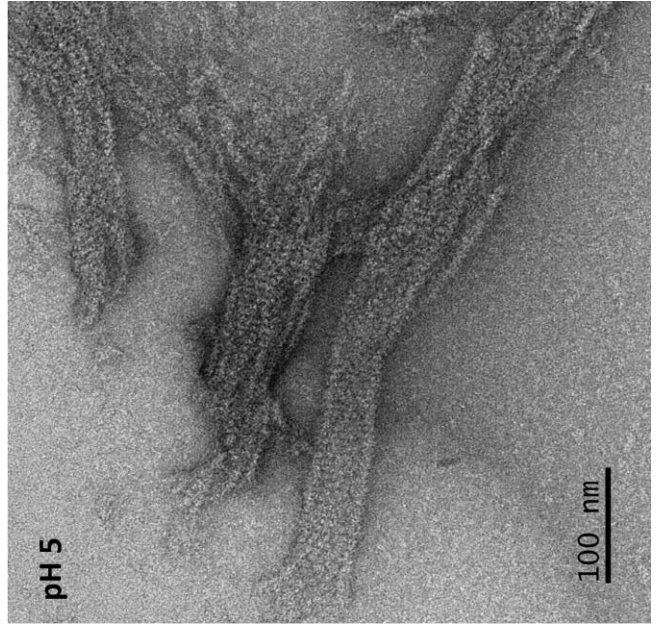
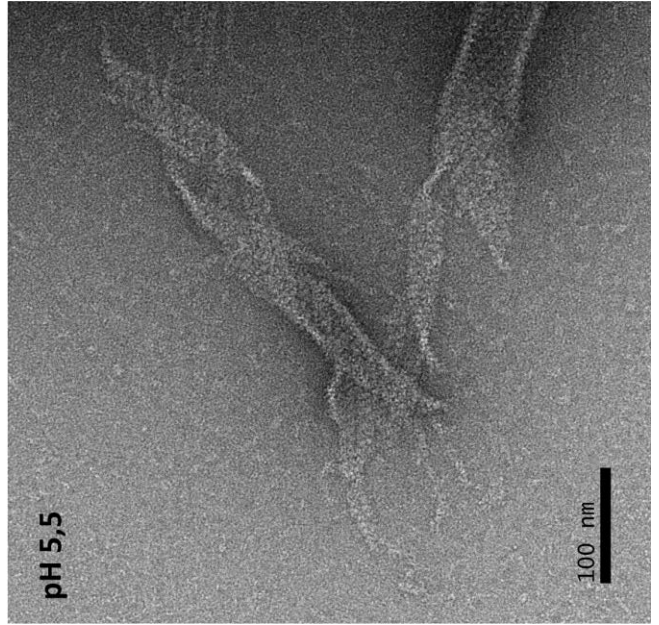
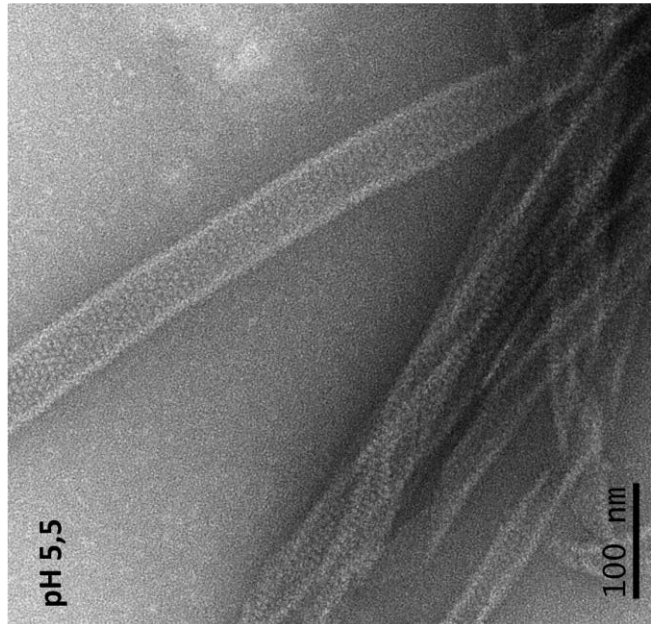
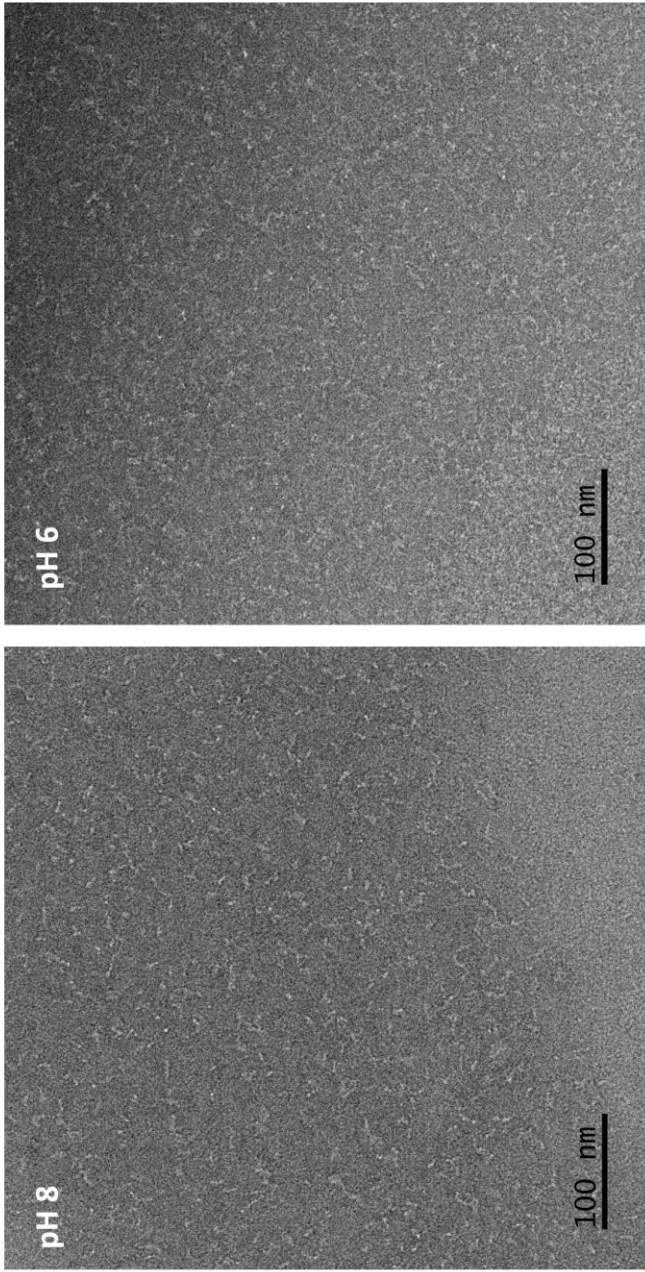


Figure 50



Contribution personnelle aux travaux publiés

Publication Nikolic J*, Belot L*, et al., 2018 (* contribution équivalente), présentée dans la partie résultat :

J'ai participé à la mise au point du protocole de purification des domaines CR. J'ai réalisé les tests d'interaction. J'ai mis au point et réalisé les expériences d'ITC.

J'ai cristallisé le complexe G-CR2, collecté les données de diffraction puis résolu sa structure.

J'ai également participé aux expériences de biologie cellulaire. Après le départ de Jovan Nikolic et le retour des remarques des referees, j'ai reproduit les tests de neutralisation et d'interaction des domaines CR avec les mutants de G en cytométrie. J'ai également réalisé toutes les expériences de pseudotypes sur les différents types cellulaires S2, BSR, et CHO en triplicate.

Revue Abou-Hamdan et al., 2018 et Belot et al., 2019.

Pour les deux revues, j'ai écrit les scripts pour le logiciel PyMol pour la réalisation des figures comportant des structures de cristallographie. Pour la revue Belot et al. 2019 j'ai réalisé toutes les figures. J'ai également participé à la relecture des manuscrits.



Structural and cellular biology of rhabdovirus entry

Laura Belot, Aurélie Albertini, Yves Gaudin¹

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, University Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

¹Corresponding author: e-mail address: yves.gaudin@i2bc.paris-saclay.fr

Contents

1. Introduction	148
1.1 The Rhabdoviridae family	148
1.2 Rhabdovirus glycoprotein G	149
2. Rhabdovirus receptors	154
2.1 General	154
2.2 Attachment factors of rhabdoviruses	154
2.3 Rhabdovirus receptors	155
3. Pathway of rhabdoviruses entry into the host cell	161
3.1 Rhabdoviruses enter cells by clathrin mediated endocytosis	161
3.2 Actin dependence of rhabdovirus entry	162
3.3 VSV transport in the endosomal pathway	162
3.4 RABV transport in the axon	164
4. Rhabdovirus-induced membrane fusion	166
4.1 Fusion properties	166
4.2 Rhabdovirus fusion pathway	167
4.3 Working of rhabdovirus fusion machinery	168
5. Conclusions and perspectives	174
References	176

Abstract

Rhabdoviruses are enveloped viruses with a negative-sense single strand RNA genome and are widespread among a great variety of organisms. In their membrane, they have a single glycoprotein (G) that mediates both virus attachment to cellular receptors and fusion between viral and endosomal membranes allowing viral genome release in the cytoplasm. We present structural and cellular aspects of Rhabdovirus entry into their host cell with a focus on vesicular stomatitis virus (VSV) and rabies virus (RABV) for which the early events of the viral cycle have been extensively studied. Recent data have shown that the only VSV receptors are the members of the LDL-R family. This is in contrast with RABV for which multiple receptors belonging to unrelated families have been identified. Despite having different receptors, after attachment, rhabdovirus internalization occurs through clathrin-mediated endocytosis (CME) in an actin-dependent

manner. There are still debates about the exact endocytic pathway of VSV in the cell and on RABV transport in the neuronal axon. In any case, fusion is triggered in the endosomal vesicle via a low-pH induced structural rearrangement of G from its pre- to its postfusion conformation. Vesiculovirus G is one of the best characterized fusion glycoproteins as the previously reported crystal structures of the pre- and postfusion states have been recently completed by those of intermediates during the structural transition. Understanding the entry pathway of rhabdoviruses may have strong impact in biotechnologies as, for example, VSV G is used for pseudotyping lentiviruses to promote efficient transduction, and VSV is a promising oncolytic virus.



1. Introduction

1.1 The Rhabdoviridae family

The Rhabdoviridae family belongs to the *Mononegavirales* order. Almost all rhabdoviruses are enveloped and have an unsegmented genome made of a single-strand RNA molecule of negative polarity (i.e., complementary of mRNAs). The virion is usually bullet shaped (having a flat base and a round tip) or bacilliform (with both tips that are rounded).

The genome (ranging from 10.8 to 16.1 kb (Walker et al., 2015)) contains up to a dozen genes, among which only five are common to all members of the family. These common genes encode the nucleoprotein (N), the phosphoprotein (P), the matrix protein (M), the glycoprotein (G) and the viral polymerase (L). The genome is associated with N, L and P to form the ribonucleoprotein (RNP), which is condensed into a tightly coiled helical structure inside the viral particle. The matrix protein forms a layer between the RNP and the lipid bilayer which contains the viral glycoprotein G that constitutes the spikes that protrude at the viral surface.

Rhabdoviruses are widespread among a great diversity of organisms such as vertebrates (mammals, birds, reptiles, fishes), invertebrates (insects, arachnids, crustaceans) and plants. Several members of the Rhabdoviridae are associated with significant pathologies in humans and livestock (Dietzgen et al., 2017).

In 2018, the Rhabdoviridae included 18 genera and one unassigned species (Moussa virus) (Walker et al., 2018). This classification is largely based on phylogenetic analyses of L protein sequences. Inside a genus, viruses generally have the same genome organization, including the number and locations of accessory genes. The two most studied genera are *Lyssavirus* and *Vesiculovirus*. Lyssaviruses infect only mammals in whom they cause deadly

encephalitis. The prototype of the genus is rabies virus (RABV). Vesiculoviruses (prototype: vesicular stomatitis virus -VSV-) and members of the genera *Ephemerovirus* (prototype: bovine ephemeral fever virus -BEFV-), *Tibrovirus*, *Hapavirus*, *Curiovirus*, *Sripuvirus* and *Ledantevirus* infect vertebrates but are transmitted by arthropods. Members of the genus *Tupavirus* have only been isolated from vertebrates as well as the members of the genera *Novirhabdovirus* (prototype: viral hemorrhagic septicemia virus -VHSV-), *Sprivivirus* (prototype: spring viraemia of carp virus -SVCV-) and *Perhabdovirus* which infect only fishes. Members of the genus *Almendravirus* replicate only in insects as well as the members of the genus *Sigmavirus* which infect only dipteran flies of a single species and are transmitted vertically. Finally, plant rhabdoviruses are assigned to the genera *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Dichorhavirus* (which have bi-segmented genomes) and *Varicosavirus* (which lack an envelope) and are transmitted by either arthropods or fungi (Walker et al., 2018).

The viral cycle of animal rhabdoviruses is initiated by the binding of their glycoprotein G to cellular receptors. Thereafter, the viral particle enters the cell via the endocytic pathway. Then, the acidic environment of the endosome induces a huge conformational change of G from a native (or prefusion) state toward a final (or postfusion) state that catalyzes fusion of the viral envelope with the endosomal membrane. This results in the release of the viral RNP in the cytoplasm for the subsequent steps of infection.

1.2 Rhabdovirus glycoprotein G

1.2.1 Basic biochemical properties

Glycoprotein G is a classic type I transmembrane protein and is synthesized on ribosomes bound to the endoplasmic reticulum (ER). After cleavage of the amino terminal signal peptide, the mature glycoprotein is usually about 500 aa long (495 for VSV and 505 for RABV). However, members of the *Ephemerovirus* genus encode mature glycoproteins which are longer, having up to 640 amino acids in the case of Obhodiang virus (Blasdell et al., 2012). It is worth noting that ephemeroviruses also encode a second nonstructural glycoprotein (G_{NS}) of unknown function, homologous to the structural one (Blasdell et al., 2012).

G is anchored in the membrane by a single α -helical transmembrane (TM) segment (Fig. 1A). The bulk of the mass of G is located outside the viral membrane and constitutes the amino-terminal ectodomain. The intra-viral domain is involved in interactions with the viral matrix protein

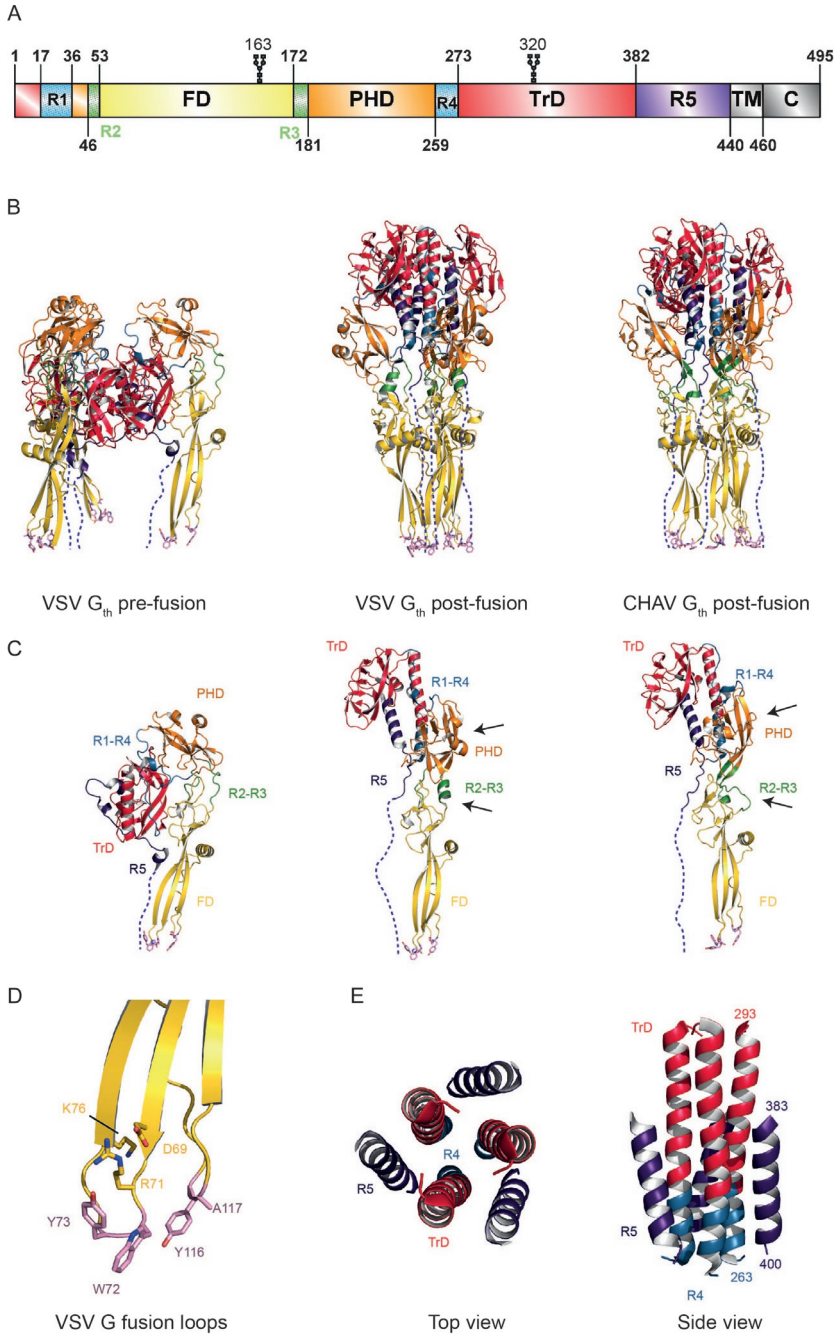


Fig. 1 See figure legend on opposite page.

(Ge et al., 2010; Lyles et al., 1992) but can also interfere with some cellular signaling pathways (Prehaud et al., 2010).

Rhabdovirus glycoproteins are N-glycosylated (Fig. 1A). The number of glycosylation sites varies from one virus to another. The oligosaccharide chains are required for correct folding of G (Gaudin, 1997; Hammond and Helenius, 1994; Mathieu et al., 1996). On the one hand, they increase the solubility of the folding intermediates in the ER (Gaudin, 1997; Mathieu et al., 1996). On the other, they favor the interaction of these intermediates with calnexin and calreticulin (Gaudin, 1997; Hammond and Helenius, 1994), which are chaperones with lectin properties.

1.2.2 Structure of G

VSV G is certainly the best characterized rhabdovirus glycoprotein (Abou-Hamdan et al., 2018; Roche et al., 2008). In the mid-2000s, the crystal structures of both the pre- and postfusion forms of the VSV G ectodomain, generated by limited proteolysis with thermolysin (G_{th} , aa residues 1–422), were determined (Roche et al., 2006, 2007). The structures of the two conformations of VSV G_{th} (Fig. 1B and C) reveal an organization distinct from those of other viral fusion proteins described so far belonging to class I (such as the influenza virus hemagglutinin –HA– and the paramyxovirus fusion protein –F–) or class II (such as the E protein of flaviviruses and E1 of alphaviruses) (Harrison, 2015). However, the comparison of the postfusion structure of VSV G_{th} with the structure of Herpes simplex virus 1 (HSV1) glycoprotein gB, which was determined at the same time (Heldwein et al., 2006), revealed that they share the same fold and,

Fig. 1 (A) Bar diagram showing the domain organization of VSV G. Glycosylation sites are indicated. Residue numbering do not take into account the signal peptide (i.e., residue 1 corresponds to the first residue of the ectodomain after cleavage of the signal peptide). (B) Ribbon diagrams of VSV G_{th} prefusion and postfusion trimers and CHAV G_{th} postfusion trimer (PDB codes: 5I2S, 5I2M and 4D6W). (C) Ribbon diagrams of VSV G_{th} prefusion and postfusion protomers and CHAV G_{th} postfusion protomer. Major structural differences between VSV G and CHAV G are indicated by black arrows. (D) Close-up view on VSV G fusion loops located at the tips of FD. Hydrophobic residues involved in membrane interaction are in pink sticks. Charged residues that limit penetration of FD inside the membrane are also represented in yellow sticks. (E) Central helix bundle of the VSV G trimer in its postfusion conformation. Color code: Trimerization domain (TrD) is in red, pleckstrin homology domain (PHD) is in orange, fusion domain (FD) is in yellow, segments R1 and R4 are in cyan, segments R2 and R3 are in green, the C-terminal segment (R5) is in purple. The dashed lines represent the missing C-terminal segment of the ectodomain that leads to the transmembrane (TM) segment.

therefore, that they have a common evolutionary origin. This fold defines the class III of viral fusion glycoproteins to which also belong the baculovirus gp64 (Kadlec et al., 2008), gB from other herpesviruses (Backovic et al., 2009; Burke and Heldwein, 2015; Chandramouli et al., 2015), and thogotovirus fusion glycoprotein (Peng et al., 2017). Amino acid sequence alignment shows that all rhabdoviruses glycoproteins have the same fold which is shared with the glycoprotein of bornaviruses (belonging to another family of *Mononegavirales*) (Garry and Garry, 2009).

The pre- and postfusion states are trimeric and the polypeptide chain of G ectodomain folds into three distinct domains (Fig. 1A–C) (Baquero et al., 2015a). The fusion domain (FD) is inserted in a loop of a pleckstrin homology domain (PHD) that is itself inserted in a trimerization domain (TrD) involved in the oligomerization of the glycoprotein in both states. Segments R1 and R4 connect TrD to PHD, while R2 and R3 connect PHD to FD. The TrD is connected to the C-terminal segment (R5) of the ectodomain. This segment itself connects to the transmembrane TM helix in the full-length glycoprotein (Baquero et al., 2015a).

The FD comprises an extended β -sheet structure terminating in a three-stranded sheet at the tip of which are located the two fusion loops which are hydrophobic motifs that interact with the target membrane during the fusion process (Fig. 1D) (Baquero et al., 2015a; Roche et al., 2006, 2007).

During the low pH-induced structural transition from pre- to postfusion state, FD, PHD and TrD retain their tertiary structure but undergo large rearrangements in their relative orientation (Fig. 1C). Globally, within the trimers, VSV G pre- and postfusion states of a protomer are related by flipping both FD and the C-terminal segment around TrD. This structural reorganization is driven by large refolding of segments R1–R5 (Baquero et al., 2015a; Roche et al., 2006, 2007).

At the end of the transition, in the postfusion state, the core of the structure is organized in a six-helix bundle, the trimeric core of which is made by the three TrD central helices (extended by the refolding of segment R4), whose grooves accommodate three lateral helices resulting in the refolding of R5 (Fig. 1E) (Baquero et al., 2015a; Roche et al., 2006, 2007).

The pre- and postfusions structures of VSV G have been observed at the viral surface by tomography either after negative staining (Libersou et al., 2010) and cryo-electron tomography (Si et al., 2018). The structures agree with the trimeric crystal structures in both conformations.

A particularity of rhabdovirus glycoprotein, and this is a major difference with other viral fusion glycoproteins, is that the low pH-induced

conformational change is reversible. This was initially demonstrated for the full-length VSV G solubilized with detergents (Doms et al., 1987) and later, by electron microscopy, for RABV G at the surface of the viral particle (Gaudin et al., 1993). In fact, there is a pH-dependent equilibrium between the prefusion state, the postfusion state and monomeric conformations that are intermediates on the pathway of the structural transition (see below) (Albertini et al., 2012; Baquero et al., 2017). This equilibrium has been demonstrated for soluble forms of VSV G (Albertini et al., 2012; Lyles et al., 1990), for RABV G and VSV G at the surface of the virion (Albertini et al., 2012; Libersou et al., 2010; Roche and Gaudin, 2002), and in vivo for VSV G in the endoplasmic reticulum (Zagouras et al., 1991). Finally, even the low pH-induced insertion of the fusion domain of VSV G (Albertini et al., 2012; Kim et al., 2017; Pak et al., 1997) and Chandipura Virus (CHAV) G (Baquero et al., 2015b) in the target membrane has been demonstrated to be reversible.

1.2.3 G antigenicity and neutralizing antibodies

As rhabdovirus glycoprotein is the only viral protein with an external domain, it is the target of neutralizing antibodies. Its antigenicity has been extensively studied for both VSV and RABV.

In the case of RABV, several hundred monoclonal antibodies (Mabs) have been used to characterize the antigenic structure of G (Benmansour et al., 1991; Lafon et al., 1983; Prehaud et al., 1988; Raux et al., 1995; Seif et al., 1985). Two major antigenic sites (site II and III) have been identified. Antigenic site II is constituted by two segments of the protein, located between positions 34 and 42 and positions 198 and 200, which are clustered in the PHD of RABV G (Prehaud et al., 1988). Antigenic site III extends from amino acid 330 to 338 (Seif et al., 1985). Beside these major antigenic sites, one minor antigenic site and a few isolated epitopes have also been described (Benmansour et al., 1991; Dietzschold et al., 1990; Lafay et al., 1996; Lafon et al., 1983; Raux et al., 1995). RABV mutants resistant to MAbs neutralization often exhibit reduced pathogenicity in mice (Fallahi et al., 2016; Prehaud et al., 1988; Seif et al., 1985). This is particularly the case for mutants escaping MAbs directed against antigenic site III, of which some have an avirulent phenotype (Coulon et al., 1998; Seif et al., 1985; Tuffereau et al., 1989).

Less work has been performed on VSV G but the major epitopes have been also located in regions corresponding to the PHD and TrD (Luo et al., 1988; Munis et al., 2018; Vandepol et al., 1986). Interestingly, a

comparison between VSV G and CHAV G domain structures (Fig. 1C) reveal that among the three domains of G, the PHD appears to be the most divergent and the largest differences are confined to its most exposed part. This is consistent with the idea that it is the major antigenic site of rhabdoviruses and that the main actor on G evolution is the circulating antibody mediated immune response (Baquero et al., 2015b).

The mechanism of rhabdovirus neutralization by MABs has also been studied. Some MABs interfere with receptor recognition, others clearly block membrane fusion (Flamand et al., 1993; Munis et al., 2018). However, in systematic studies performed on RABV, it was shown that neutralization is essentially dependent on the number of antibodies bound per virion (Flamand et al., 1993; Raux et al., 1995).



2. Rhabdovirus receptors

2.1 General

As any other viruses, in order to infect the host cell, rhabdoviruses must bind to molecules present at the cell surface. Depending on the consequences of the interaction, those molecules have been classified in two categories (Marsh and Helenius, 2006). The first category contains attachment factors. They are molecules (such as heparan sulfate or gangliosides) which interact weakly, in a nonspecific manner with the virions to concentrate them at the cell surface. The second category contains the viral receptors per se which actively trigger entry, particularly by promoting endocytic internalization.

2.2 Attachment factors of rhabdoviruses

Several rather ubiquitous molecules have long been considered to be rhabdovirus receptors. A reassessment of their role suggests that they are at best viral attachment factors.

As an example, phosphatidylserine (PS) has been proposed to be a VSV receptor (Schlegel et al., 1983). This was dubious as PS is only present at the surface of apoptotic cells and indeed it was demonstrated that it is not a receptor for VSV (Coil and Miller, 2004). Other older studies also proposed that gangliosides might play the role of the receptors in chicken embryo related (CER) cells (Sinibaldi et al., 1985). Taken together (and in view of the recent identification of real VSV receptors), those data suggest that negatively charged molecules probably concentrate VSV particles at the host cell surface.

In the case of RABV, host cell treatment with different phospholipases reduces binding, which suggests that some phospholipids can play a role at initial stages of infection (Superti et al., 1984b). Similarly, cell pretreatment with neuraminidase renders them nonsusceptible to RABV infection (Conti et al., 1986). After incorporation of exogenous gangliosides, cells recover their susceptibility to RABV infection (Superti et al., 1986). Here again, at best, those data suggest that negatively charged molecules concentrate RABV particles at the cell surface.

It is worth noting that all those attachment factors were identified with strains adapted to laboratory cell lines. In the case of RABV, except for the very beginning and end of the infectious process, non-lab-adapted isolates exclusively multiply and propagate in neurons, and in vitro, they can only infect established cell lines of neuronal origin. It is possible that the ability to bind negatively charged molecules at the host cell surface is a general consequence of adaptation and it is not clear whether the identified attachment factors are used by natural isolates during animal infection.

2.3 Rhabdovirus receptors

2.3.1 LDL receptor and the members of its family are VSV receptors

VSV has a wide host spectrum: it infects both vertebrate and insect cells. This broad tropism suggested that VSV enters cells through highly ubiquitous receptors. These receptors have been identified: they are the members of the low density lipoproteins receptor (LDL-R) family (Finkelshtein et al., 2013). The widespread expression of this receptor family, including in insects, accounts for the pantropism of VSV. It also explains why lentiviruses pseudotyped by VSV G do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and hematopoietic stem cells, as they have a very low expression level of LDL-R (Amirache et al., 2014).

The LDL-R is a type I transmembrane protein which regulates cholesterol homeostasis in mammalian cells (Brown and Goldstein, 1986). It removes cholesterol-carrying lipoproteins from plasma circulation. Ligands bound extracellularly by LDL-R at neutral pH are internalized. The intracellular release of the cargo, leading to its subsequent lysosomal degradation, is driven by a low pH-induced conformational change of LDL-R from an open to a more compact conformation (Beglova and Blacklow, 2005; Rudenko et al., 2002). The receptor then recycles back to the cell surface. LDL-R ectodomain is composed of a ligand-binding domain, an epidermal growth factor (EGF) precursor homology domain and a C-terminal domain enriched in O-linked oligosaccharides. The ligand binding domain is made

of 7 cysteine-rich repeats (CR1–CR7). Each repeat is made of ~ 40 amino acids and contains 6 cysteine residues, engaged in 3 disulfide bridges, and an acidic residues cluster that forms an octahedral calcium cage (Rudenko et al., 2002) (Fig. 2A).

Both recombinant soluble CR2 and CR3 domains (but not the other ones) of LDL-R bind to VSV G with similar affinities ($K_d \sim 5 \mu\text{M}$) and neutralize viral infectivity when incubated with the viral inoculum prior infection (Nikolic et al., 2018).

G_{th} in complex with either CR2 or CR3 was crystallized. The binding site of CR domains on G is the same in both crystals (Fig. 2B and C). It is essentially constituted by two segments of the trimerization domain (TrD), one of the pleckstrin homology domain (PHD) and part of segment R2. The surface of interaction breaks apart upon G conformational change, which explains the inability of CR domains to bind G postfusion state (Nikolic et al., 2018).

Five residues (H8, K47, A51, Y209 and R354) of G were in direct contact with the CR domain in both complexes (Fig. 2B and C). Among those residues, K47 and R354 appear to be key for the interaction with both CR2 and CR3 as mutant glycoproteins in which they are replaced by an alanine or a glutamine are unable to bind CR domains. Remarkably, those mutant glycoproteins retain their ability to induce syncytia formation at low pH when expressed in cells by plasmid transfection. Therefore, in the case of VSV G, the fusion activity and receptor binding activity can be uncoupled (Nikolic et al., 2018).

Taking advantage of the properties of the receptor-associated protein (RAP), a common ligand of all LDL-R family members which blocks ligand binding to all LDL-R family members with the exception of LDL-R itself (Bu and Marzolo, 2000; Finkelshtein et al., 2013; Willnow, 1998), the role of other LDL-R family members as VSV receptors has been investigated. RAP was shown to significantly inhibit VSV infection in LDL-R deficient HAP cell lines but not in wild type (WT) HAP cells (Nikolic et al., 2018). Those results indicated that VSV can use other LDL-R family members as alternative receptors (Finkelshtein et al., 2013; Nikolic et al., 2018).

Finally, G mutants affected in CR binding cannot pseudotype a recombinant VSV (VSV Δ G-GFP) in which the G gene has been replaced by the green fluorescent protein (GFP) gene. As the mutant glycoproteins are incorporated into the virions envelope as efficiently as WT G and as their fusion activity is unaffected, the loss of infectivity of pseudotypes bearing a mutant glycoprotein is due to their disability to recognize a cellular receptor (Nikolic et al., 2018).

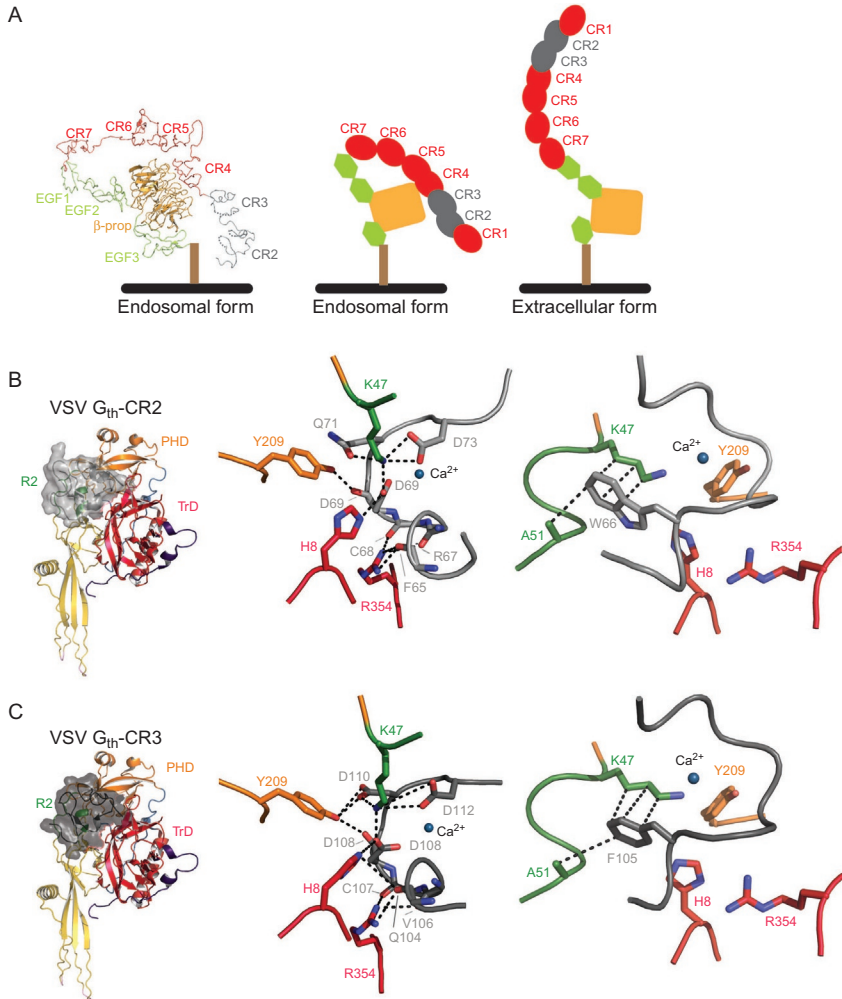


Fig. 2 (A) Ribbon diagram of the low pH structure of LDL-R (i.e., as in the endosome environment) (Rudenko et al., 2002) (PDB code: 1N7D) and cartoon representing the putative structure of LDL-R at the cell surface and inside the endosome after LDL release. (B) Overview of G_{th}-CR2 and (C) G_{th}-CR3 crystalline structures (PDB codes: 5OYL and 5OY9). In the first row, G is in ribbon representation and depicted by domains and CR domains are in full atom view. In both complexes the CR domain is nested in the same cavity of G. In the second row, close-up view on the G-CR interface showing the docking of G basic residues on the acidic patch of both CR2 and CR3. In both cases, the same G residues (H8, K47, Y209 and R354) are involved in the interaction. Third row, close-up view on the G-CR interface showing the hydrophobic interactions between the aromatic residue W66 of CR2 and F105 of CR3 and residues K47 and A51 of VSV G. Same color code than in Fig. 1, the calcium ion of the CR domains is depicted as a deep blue sphere. On each CR domain, residues involved in contacts with G are in gray and putative bonds are shown as black dashed lines. Oxygen atoms are in red and nitrogen atoms in blue.

This was observed in different cell lines (mammalian HEK, BSR, CHO and drosophila S2 cells). This strongly suggests that the only receptors of VSV, including in insect cells, are members of the LDL-R family or other transmembrane proteins containing similar CR domains. Therefore, VSV G has specifically evolved to interact with CR domains of the members of the LDL-R family (Nikolic et al., 2018).

Interestingly, it had been previously shown that the endoplasmic reticulum chaperone gp96 is essential for VSV infection (Bloor et al., 2010). Indeed, cells without gp96 or with catalytically inactive gp96 do not bind VSV G. Therefore, it had been proposed that gp96 is essential for the occurrence of functional VSV G receptors at the cell surface (Bloor et al., 2010). Indeed, it has been demonstrated that gp96-deficient cells present a marked decrease in cell surface expression of four members of the extended LDL receptor family (LDL-R, LRP6, Sorl1 and LRP8) (Weekes et al., 2012) in perfect agreement with the role of this receptor family in VSV entry.

2.3.2 Other VSV receptors?

Recently, it has been suggested that another cellular protein (Lgr4, leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4) is essential for VSV and VSV G pseudotyped lentivirus to infect susceptible cells (Zhang et al., 2017). However, the effect of the deletion of the Lgr4 gene is particularly pronounced on VSV infection of peritoneal macrophages which are not the natural host cells of the virus.

Furthermore, the interpretation of several experiments is questionable as pointed out in a commentary of the article (Rubinstein, 2018). Particularly, to demonstrate the interaction between VSV G and Lgr4, the authors co-expressed the ectodomains of both proteins without their signal peptide (Zhang et al., 2017). Therefore, the proteins were not translocated into the ER and were probably misfolded and aggregated. Similarly, surface plasmon resonance experiments were difficult to interpret, as most of the binding is irreversible. Finally, the Lgr4 ectodomain was much less potent (by more than three orders of magnitude) than the LDL-R ectodomain in inhibition experiments (Rubinstein, 2018; Zhang et al., 2017).

Therefore, although a role of Lgr4 during VSV infection cannot be excluded, this molecule is probably not another viral receptor.

2.3.3 RABV receptors

Four proteins have been proposed to play the role of RABV receptors (Guo et al., 2019) (inset in Fig. 4).

First, since a segment of RABV G exhibits sequence similarity to the snake venom curaremimetic neurotoxins, which are potent ligands of nAChR, it has been proposed that the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) acts as a RABV receptor (Lentz et al., 1982, 1984). This hypothesis was reinforced by the demonstration that RABV interacts with purified Torpedo nAChR (Lentz et al., 1986), more precisely with its α subunit in an overlay assay (Gastka et al., 1996). Finally, a study in which mouse dorsal root ganglion (DRG) cells were treated with several nicotinic antagonists, showed that mecamylamine and d-tubocurarine reduce the percentage of infected neurons (Castellanos et al., 1997). However, there is no direct evidence in animal models that nAChR is a RABV receptor. Furthermore, RABV can infect neurons that do not express nAChR, and nAChR is located mainly on the muscle side of the neuromuscular junctions (McGehee and Role, 1995). Thus, although nAChR could account for the ability of RABV isolates to multiply locally in myotubes at the site of inoculation (Burrage et al., 1985), before subsequent penetration into neurons, other receptors are required for RABV entry into neurons.

The second protein that has been suggested to be a RABV receptor is the neural cell adhesion molecule (NCAM) (Thoulouze et al., 1998). This was based on the following observations. First, incubation of several cell lines with RABV decreased the surface expression of NCAM. Second, treatment of susceptible cells with heparan sulfate, a ligand for NCAM, or with NCAM antibodies reduced the rabies virus infection. Third, when RABV was preincubated with a soluble form of NCAM, it was unable to infect susceptible cells. Fourth, the transfection of RABV-resistant L fibroblasts with NCAM-encoding gene induces RABV susceptibility. Finally, the infection of NCAM-deficient mice by RABV resulted in a slightly delayed mortality and a restricted brain invasion (Thoulouze et al., 1998).

At the same time, the murine low-affinity nerve-growth factor receptor, p75NTR was identified as a ligand of a soluble form of RABV G (Tuffereau et al., 1998). The ability of RABV G to bind p75NTR required the presence in G of a lysine and an arginine in positions 330 and 333, respectively, which were known to control virus penetration into the motor and sensory neurons of adult mice (Coulon et al., 1998; Seif et al., 1985; Tuffereau et al., 1989). Furthermore, expression of p75NTR in BSR cells (a clone of BHK21 cells) renders the cell line permissive for a non-adapted fox RABV isolate. Finally, G of lyssavirus genotype 6 (European bat lyssavirus type 2)—but not of genotype 3 (Mokola virus), 4 (Duvenhage virus) and 5 (European bat lyssavirus type 1)—was also shown to bind

p75NTR (Tuffereau et al., 2001). Nevertheless, mice lacking all the extracellular part of p75NTR were still susceptible to infection (of which the rate and specificity were unchanged), indicating that the interaction between RABV G and p75NTR is not necessary for RABV infection of primary neurons (Tuffereau et al., 2007). However, recent data suggest that RABV may employ p75NTR-dependent transport as a fast pathway to facilitate transport to the central nervous system (CNS) (Gluska et al., 2014).

More recently, a global RNAi strategy developed to screen potential host factors for RABV infection in the human embryonic kidney cell line (HEK293) identified the metabotropic glutamate receptor subtype 2 (mGluR2) as essential for RABV infection (Wang et al., 2018). mGluR2 is a seven-transmembrane receptor and is conserved among mammals. It is abundant in the CNS and very rarely expressed in other tissues (Ohishi et al., 1993). By coimmunoprecipitation of tagged versions of RABV G and mGluR2, it was shown that both proteins interact together. Furthermore, mGluR2 antibodies block RABV infection in cells and a soluble version of the receptor neutralizes RABV infection. Finally, flow cytometry showed that RABV infection led to a decrease in cell surface expression of mGluR2 and that RABV and mGluR2 are internalized into cells and transported to early and late endosomes together. Therefore, mGluR2 has the characteristics to be a RABV receptor. However, in infected mice, the authors observed that some RABV-infected neuronal cells did not seem to express mGluR2 (Wang et al., 2018).

Although extensive studies have been performed to identify RABV receptors, no transmembrane protein has been definitively proved to have such a role. This complex situation may arise from the fact that RABV probably use several receptors. Indeed, experiments performed with an avirulent mutant have shown that some neuronal cells, permissive for the parental CVS strain, are not infected by the mutant. This indicates that the CVS strain is able to bind several distinct receptors to penetrate different neurons, while the avirulent mutant only recognizes some of them (Lafay et al., 1991).

Finally, African green monkey kidney cells (BS-C-1) which do not express p75NTR, nor NCAM, nor nAChR, nor most probably mGluR2 (as BS-C-1 have characteristics of epithelial cells) are susceptible to RABV infection (Piccinotti et al., 2013). Therefore, other factors remain to be identified. It is not excluded that these factors are specifically present in epithelial cells and are required for the final stages of disease, when virus spreads from the CNS to a variety of extraneural tissues.

2.3.4 Receptors of other rhabdoviruses

Much less is known concerning the receptors of other rhabdoviruses. The receptors or putative receptors that have been identified for VSV and RABV are not used by other rhabdoviruses even from the same genus. As mentioned above, lyssaviruses such as Mokola virus, Duvenhage virus or European bat lyssavirus type 1 do not bind to p75NTR (Tuffereau et al., 2001). Similarly, CHAV G does not bind CR domains from LDL-R (Nikolic et al., 2018).

In fact, hitherto, the only convincing data for another rhabdovirus receptor have been obtained for the viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), a salmonid novirhabdovirus, for which it has been shown that monoclonal antibodies (MABs) directed against a fibronectin-containing complex protect cells from the infection. Since fibronectin, purified from rainbow trout, binds specifically to VHSV, fibronectin has been proposed to be a receptor for VHSV and some other fish rhabdoviruses (Bearzotti et al., 1999).



3. Pathway of rhabdoviruses entry into the host cell

3.1 Rhabdoviruses enter cells by clathrin mediated endocytosis

Binding of rhabdoviruses to their receptor triggers the endocytosis of the virion. All the rhabdoviruses studied so far, including RABV (Lewis and Lentz, 1998; Lewis et al., 1998; Piccinotti et al., 2013; Superti et al., 1984a), VSV (Cureton et al., 2009, 2010; Johannsdottir et al., 2009; Sun et al., 2005; Superti et al., 1987), BEFV (Cheng et al., 2012), SVCV (Shao et al., 2016) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV, a Novirhabdovirus) (Liu et al., 2011) use clathrin-mediated endocytosis (CME) to enter the host cell.

RABV, VSV, BEFV and SVCV endocytosis was shown to be dependent on dynamin (Cheng et al., 2012; Johannsdottir et al., 2009; Piccinotti et al., 2013; Shao et al., 2016). However, for both RABV and VSV, it does not show a strict requirement of the adaptor protein AP-2 (Johannsdottir et al., 2009; Piccinotti et al., 2013). In the case of VSV, this is consistent with the CME of LDL-R which itself is not strictly dependent on AP-2 (Motley et al., 2003).

Endocytosis of VSV is a fast process with a half time-life of 2.5–3 min (Johannsdottir et al., 2009). After binding, virions do not laterally diffuse into preformed pits but are internalized by pits that form at or near viral

particles (Cureton et al., 2009). Similar observations have been made with a recombinant VSV, in which the VSV G was replaced by RABV G, as a surrogate of RABV (Piccinotti et al., 2013).

3.2 Actin dependence of rhabdovirus entry

All rhabdoviruses are significantly larger than the dimensions of a typical clathrin-coated vesicle which has an average interior diameter of 60 nm. Virion-containing vesicles are more elongated than empty vesicles arising from CME. On average, they contain more clathrin and clathrin adaptor molecules. However, this increase is insufficient to permit full coating of the vesicle (Cureton et al., 2009) and the electron-dense material (corresponding to the clathrin coat) is only visible on the vesicle surface next to the spherical end of the virion (Fig. 3).

The complete uptake of the clathrin structures that internalize VSV particles is dependent on actin polymerization (Fig. 3), and treatment of cells with either cytochalasin D or latrunculin B (which disrupt actin filaments) inhibits entry by blocking the transition of virus-containing pits to cytosolic vesicles (Cureton et al., 2009). The requirement of actin assembly for efficient VSV entry is due to the length of the viral particle as, in contrast, the entry of defective interfering particles that are shorter (75 nm long vs 200 nm for VSV), does not depend on actin polymerization (Cureton et al., 2010).

3.3 VSV transport in the endosomal pathway

Taking advantage of the fact that ammonium chloride (NH_4Cl) is a weak base that inhibits endosomal acidification and thus prevents the low pH-induced activation of VSV G, it was shown that fusion occurs rapidly after endocytosis, within 1–2 min after internalization (Johannsdottir et al., 2009). Given the rapidity of the process, the low pH-induced structural transition of G, which catalyzes fusion, most likely occurs in early endosomes (Fig. 3, pathway (i)).

This is in agreement with experiments showing that dominant negative forms of RAB 5 that block the maturation of endocytic vesicles to early endosomes inhibit VSV infection whereas a dominant negative form of RAB 7 (that blocks the traffic from the early to the late endosome) or RAB 11 (that blocks transport of endocytosed cargoes to recycling endosomes) is without effect on VSV infection (Mire et al., 2010; Sieczkarski and Whittaker, 2003).

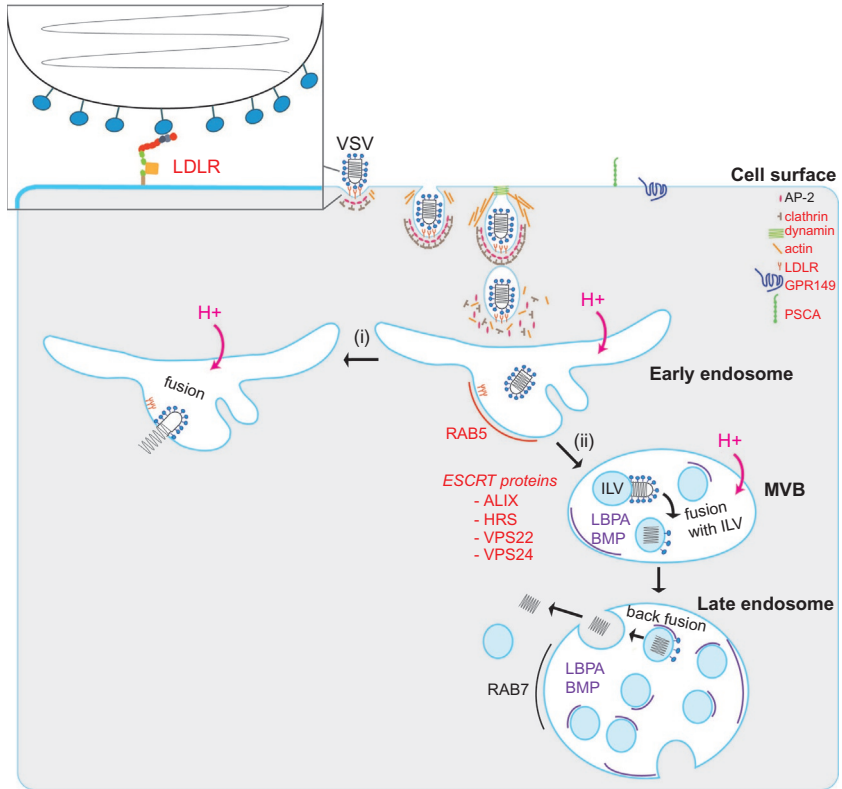


Fig. 3 Proposed pathways for VSV entry into the host cell. Binding of VSV G to the LDL-R triggers endocytosis of VSV particles. The endocytosis vesicle is only partially coated with clathrin. Efficient viral entry requires actin polymerization. Two pathways have been proposed. Pathway (i): fusion occurs rapidly in the early endosome and leads to the release of the RNP in the cytoplasm. Pathway (ii): inside multivesicular bodies, VSV fuses first with an intraluminal vesicle (ILV) in which the RNP is released. In the late endosome, these vesicles deliver the RNP to the cytoplasm through a back-fusion mechanism. Proteins that have been implicated in VSV entry have their name in red. Endosome-specific lipids which favor VSV fusion have their name in purple.

However, this classical view is challenged by experimental data which suggest that the acid-activated fusion of VSV and the release of the RNP into the cytosol occur in two distinct steps (Le Blanc et al., 2005; Luyet et al., 2008) (Fig. 3, pathway (ii)). The viral envelope would first fuse with an intraluminal vesicle (ILV) within the multivesicular bodies (MVB). A second fusion step (often called back-fusion, implicating the action of a cellular machinery) between the ILV and the limiting MVB membrane would then be required to release the RNP into the cytosol. This view is

supported by several experimental data. First, fusion and RNA release into the cytosol can be uncoupled in presence of nocodazole which depolymerizes the microtubules. Indeed, nocodazole has no effect on the fusion of individual VSV particles while it significantly reduces RNA release (Le Blanc et al., 2005). Second, siRNA depletion of several subunits of the ESCRT machinery (including ALIX, HRS, VPS22 and VPS24), which are involved in the formation of ILVs, reduces VSV infection to 30%–50% of the control (Le Blanc et al., 2005; Pasqual et al., 2011). Third, a monoclonal antibody which binds to lysobisphosphatidic acid (LBPA) or bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), which are both late endosome-specific phospholipids, inhibits VSV infection in a dose-dependent manner (Le Blanc et al., 2005). Finally, *in vitro*, it was shown that BMP promotes VSV fusion when present in target liposomes (Roth and Whittaker, 2011).

Therefore, the precise mechanisms involved in VSV entry remain to be elucidated. It cannot be excluded that VSV uses different entry pathways depending on the cells and their physiological state.

Finally, a genome-wide small interfering RNA screen identified several host factors required for VSV infection (Lee et al., 2014). Bypassing CME rescued the viral gene expression defect for three identified cellular genes (encoding GPR149, PSCA, and LSM5), implicating these genes in VSV entry (Lee et al., 2014). GPR149 (G-protein-coupled receptor 149) is a transmembrane protein that is conserved in vertebrates (Edson et al., 2010), while PSCA (prostate stem cell antigen) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane glycoprotein that is overexpressed in prostate cancers (Reiter et al., 1998). The cell membrane localization of GPR149 and PSCA is consistent with their assignment as potential entry factors (Fig. 3). In contrast, LSM5 (U6 snRNA-associated Sm-like protein) is mostly located in the nucleus and its role in VSV entry is probably indirect.

3.4 RABV transport in the axon

In the case of RABV, two different pathways were proposed for the transport through the axon to the soma where transcription and replication take place: either fusion occurs early and the RNP is transported alone or the whole viral particle is transported inside the endocytic vesicle. It is now clear that the predominant RABV entry pathway into neuron is the latter (Fig. 4).

First, it was demonstrated that lentiviruses pseudotyped with RABV G were transported in a retrograde way and reach the central nervous system

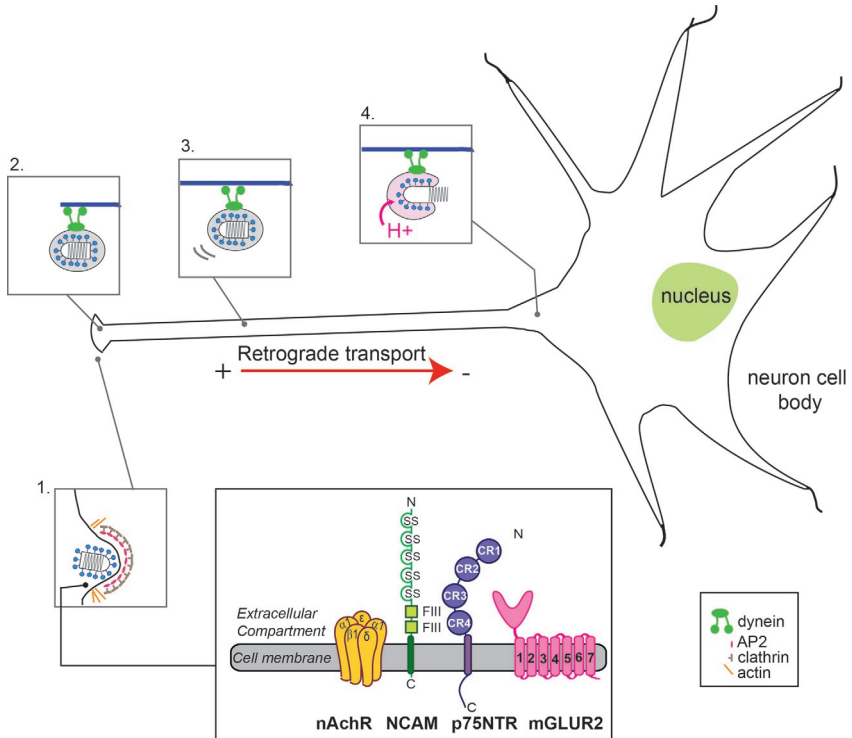


Fig. 4 Proposed mechanism for RABV entry and retrograde transport into neurons. After receptor recognition, the virion is endocytosed in partially clathrin-coated vesicles (1) and transported in an endocytic vesicle (2) along the axon via microtubules to the soma (3). Endosome acidification occurs at the soma leading to membrane fusion and RNP release (4).

after peripheral delivery (Mazarakis et al., 2001). This was not the case when VSV G-pseudotyped vectors were used. This indicated that RABV G but not VSV G allows long distance transport along axons and suggested that, in the case of RABV infection, the whole virion is transported inside a vesicle (Mazarakis et al., 2001).

This was demonstrated in murine neuroblastoma NS20Y cells using double fluorescently labeled RABV particles containing an eGFP fused to the RABV P protein and in whose membrane was inserted an engineered red fluorescent protein comprising RABV G C-terminal transmembrane segment and cytoplasmic domain. Such fluorescent particles allowed the discrimination of enveloped virus from free RNPs in live fluorescence microscopy experiments and indicated that in NS20Y cells enveloped RABV particles are transported as a cargo inside vesicles by typical retrograde axonal

transport (Klingen et al., 2008). Similar observations were later made in sensory neurons from dorsal root ganglia and in motor neurons (Gluska et al., 2014; Piccinotti and Whelan, 2016).

Single particle experiments confirmed that, in primary neurons, CME is a major route of RABV endocytosis in both motor and sensory neurons. However, in motor neurons derived from the ventral spinal cords, a significant fraction of incoming particles did not colocalize with transferrin, or fluorescent dextran, suggesting that some virions enter independently of clathrin or macropinocytic uptake mechanisms (Piccinotti and Whelan, 2016).

There is still a debate about the acidification site of RABV containing vesicles. Some experiments with the SAD vaccine strain of RABV provided evidence for transport within acidified endosomes (Gluska et al., 2014) whereas another study performed with a recombinant VSV expressing CVS strain RABV G suggested that acidification of virion containing vesicle occurs primarily in the neuronal soma (Piccinotti and Whelan, 2016) (Fig. 4). The ability to tolerate mild acidification during axonal transport might be related to intrinsic properties of G from different strains as the kinetics of the low-pH induced structural transition vary significantly from one strain to another (Gaudin et al., 1995).

Finally, it is worth noting that some neurons seem to be resistant to retrograde infection by RABV. This is the case of two classes of unmyelinated sensory neurons (nonpeptidergic -NP- and C-fiber low-threshold mechanoreceptor -TH- neurons), which account for almost half of the total dorsal root ganglion neuron population, are largely resistant to rabies virus infection from the spinal cord (Albisetti et al., 2017). None of the expression patterns of the identified RABV receptors could explain the resistance of those neurons to rabies infection (Albisetti et al., 2017). It is thus possible that some yet unknown structural properties of NP and TH neurons or of their axons impede virus progression to the soma.



4. Rhabdovirus-induced membrane fusion

4.1 Fusion properties

Fusion of RABV and VSV with artificial liposomes (Gaudin et al., 1991, 1993, 1995, 1996; Roche and Gaudin, 2004; Roth and Whittaker, 2011; Yamada and Ohnishi, 1986) and with cells (Clague et al., 1990; Puri et al., 1988, 1992) have been largely characterized. From these studies, it appears that neither RABV (Gaudin et al., 1991) nor VSV (Herrmann

et al., 1990; Yamada and Ohnishi, 1986) have an absolute specific lipid requirement for fusion. However, as mentioned above, some late endosome specific lipids such as BMP enhance VSV fusion when present in the target membrane (Roth and Whittaker, 2011).

The pH-dependence of fusion has been characterized for several rhabdoviruses and is very similar from one rhabdovirus to another being optimal around pH 6 (Clague et al., 1990; Gaudin et al., 1999; Roche and Gaudin, 2004).

As for other viruses that fuse at low pH, preincubation of the rhabdoviruses at low pH in the absence of a target membrane leads to the inactivation of the viral fusion properties (Clague et al., 1990; Gaudin et al., 1991). The inactivation process is more rapid at higher temperature and lower pH and is due to G structural transition toward its postfusion conformation. However, as G structural transition is reversible, re-incubation of the acidified virions at pH above pH 7 for 1 or 2 h leads to the recovery of their initial fusion activity (Gaudin et al., 1991, 1993).

The reversibility of the conformational change is required to allow newly synthesized G to be transported through the acidic compartments of the Golgi apparatus and to recover its native prefusion state when reaching the cell surface to be incorporated in newly synthesized virions (Gaudin et al., 1995). Other viruses, for which the low-pH induced structural transition is irreversible, have evolved different strategies to protect their fusion proteins in the acidic compartments of the Golgi apparatus (Gaudin, 2000b).

4.2 Rhabdovirus fusion pathway

The existence of a pH-dependent equilibrium between the different states of rhabdovirus G indicates that, differently from other viral fusion glycoproteins, the native conformation is not metastable. In general, it is proposed that the high amount of energy released during the conformational change from the metastable prefusion state to the final stable postfusion state is used to form the high energy lipidic intermediates during the fusion reaction (Carr et al., 1997; Harrison, 2015). In the case of rhabdoviruses, the amount of free energy released during the structural transition of a single G trimer is small compared to that released by fusion glycoproteins having a metastable native state such as HA and compared to the energy barrier of the fusion reaction (the activation energy of the fusion process has been estimated to be in the range of 40kcal/mol (Kuzmin et al., 2001; Lee and Lentz, 1998)). Therefore, a concerted action of several G trimers is required to

overcome this energy barrier. For RABV, the number of spikes required for the fusion reaction has been estimated to be approximately 15 (Roche and Gaudin, 2002).

Despite this major difference between rhabdoviral G and other viral fusion glycoprotein, experimental data, mainly obtained using lipids with various dynamic molecular shapes, suggest that the membrane fusion pathway is the same for rhabdoviruses as for other enveloped viruses (Chernomordik et al., 1998; Gaudin, 2000a; Zaitseva et al., 2005). Fusion proceeds via the formation of an intermediate stalk that forms a local lipid connection between the outer leaflets of the fusing membranes. Radial expansion of the stalk then induces the formation of a transient hemifusion diaphragm (i.e., a local bilayer composed of the two initial inner leaflets). The last step, the most energetically expensive (Cohen and Melikyan, 2004), is the formation and enlargement of a fusion pore within the hemifusion diaphragm, which results in complete fusion (Chernomordik and Kozlov, 2005; Chernomordik et al., 1995). In the case of RABV, the fusion process can be arrested at pH 6.4 and 4°C and an intermediate can be trapped which is probably at the stage of initial pore formation (Gaudin, 2000a).

In the case of VSV, electron microscopy revealed that fusion of viral particles with liposomes occurs preferentially at the flat base of the virion (Libersou et al., 2010). In this experimental context, the VSV fusion pathway seems to involve two distinct stages. The first stage occurs at the flat base and involves local membrane deformations, leading to the formation of one or several stalks, and the formation of one or several initial fusion pores. From simulations of hemifusion kinetic data, the critical number of G trimers required at this stage was estimated to be 3–5 (Kim et al., 2017). Then, the formation of a helical glycoprotein network outside the contact zone, on the cylindrical part of the virion, leads to the enlargement of these initial pores, completing the fusion of the membranes (Libersou et al., 2010). Network formation involves favorable lateral interactions between glycoproteins, in their low pH conformation and probably allows overcoming the high energy barrier required for pore enlargement.

4.3 Working of rhabdovirus fusion machinery

4.3.1 Fusion loops interaction with the target membrane

The FD structural organization is well conserved among class III glycoproteins (Baquero et al., 2015a). As mentioned above, its core is a three-stranded β -sheet at the tip of which are located two hydrophobic loops that

interact with the target membrane (and maybe also with the viral one) (Fig. 1D). An alignment of the amino-acid sequences of several rhabdovirus glycoproteins reveals that these loops always contain polar aromatic residues (tryptophans and tyrosines) (Roche et al., 2008). That these loops are indeed an essential part of the membrane-interacting motif is consistent with mutagenesis work performed on VSV (Stanifer et al., 2011; Sun et al., 2008). The presence of charged residues in the vicinity of the fusion loops precludes any deep penetration inside the membrane (Fig. 1D). Most probably, tryptophan and tyrosines position themselves at the interface between the fatty acid chains and head group layers of lipids (Wimley and White, 1992) and perturb the outer leaflet of the target membrane. This interfacial interaction facilitates the formation of point-like lipidic protrusions that have been suggested to be stalk precursors (Efrat et al., 2007).

4.3.2 *pH-sensitive switches*

Amino acids playing an important role during the structural transition have been identified. In the case of vesiculovirus G, a cluster of four histidine residues (in position 60, 162, 407 and 409) in the prefusion structure, which are conserved among the rhabdovirus family, has been proposed to play the role of pH-sensitive switch (Fig. 5A). Indeed, the histidine protonation might trigger the low pH-induced conformational change (Roche et al., 2007). Protonation of these histidine residues leads to a cluster of positive charges that might create a repulsive force between the FD and the C-terminal part of G ectodomain (segment R5) and initiate the glycoprotein refolding. This is consistent with the inhibition of VSV fusion by diethylpyrocarbonate, a reagent specifically modifying histidine residues (Carneiro et al., 2003).

Clusters of acidic residues are observed in the six-helix bundle constituting the core of the VSV G postfusion state (Fig. 5B). It had been proposed that their deprotonation at high pH destabilizes this central domain and, consequently, allows G refolding back toward its prefusion conformation. Indeed, a mutagenesis analysis demonstrated that the cluster of the three Asp 268 residues, buried in the center of the hydrophobic environment of the postfusion trimeric interface, constitutes a major pH-sensitive molecular switch while Asp274, Asp395, and Asp393 have additional contributions (Ferlin et al., 2014).

Interestingly, this VSV G switch is not found in CHAV G. In fact, the CHAV G switch triggering the conformational change back to the prefusion state, involves other acidic residues of which the deprotonation

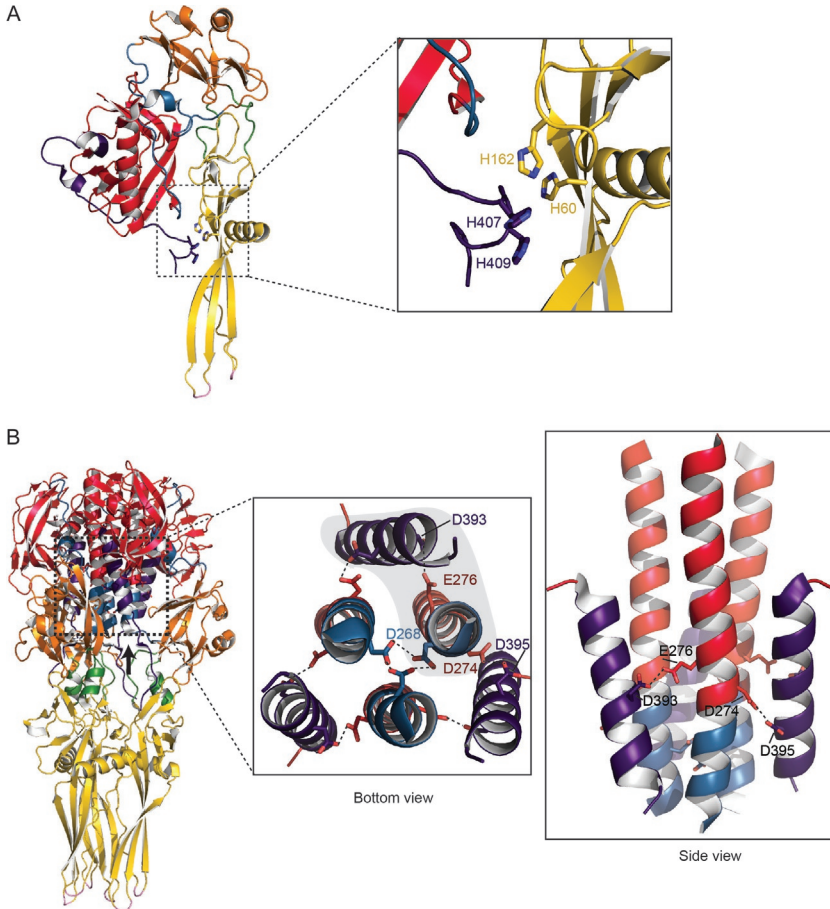


Fig. 5 (A) Close-up on the histidines cluster (represented in sticks) in the prefusion VSV G protomer. (B) Close-up on the acidic amino-acids buried in the six-helix bundle of the postfusion conformation. Hydrogen bonds between lateral chains in their protonated form are indicated. The black arrow on the whole trimeric structure indicates the position of the observer for the bottom view. In the bottom view, helices belonging to the same protomer are surrounded by a gray background. Oxygen atoms are in red and nitrogen atoms in blue.

at high pH also destabilizes the postfusion protomer of CHAV G (Baquero et al., 2015b).

It is worth noting that the regions corresponding to segment R4 and R5 in other Rhabdovirus glycoproteins are often enriched in acidic amino acid residues which can also play a similar role of pH-sensitive molecular switches.

4.3.3 G structural transition occurs through monomeric intermediates

The low pH-induced structural transition of G_{th} (the soluble ectodomain form that was previously crystallized) has been characterized in solution using several biophysical techniques. While G_{th} postfusion trimer is the major species detected at pH below 6.7, the prefusion trimer is never observed in solution (Albertini et al., 2012). This is in perfect agreement with previous studies performed on a soluble form obtained after treatment of the virion with cathepsin D (Crimmins et al., 1983) but also on full length detergent solubilized G (Doms et al., 1987). In fact, above pH 7, G_{th} appears to be a flexible monomer that populates a manifold of conformations in a pH-dependent manner adopting more elongated conformations at lower pH (Albertini et al., 2012).

Analyses of vesiculovirus G structure at the viral surface using electron microscopy and tomography give very similar results. Indeed, below pH 6, the only structure observed in the viral membrane is the trimeric postfusion state which tends to reorganize into helical arrays (Libersou et al., 2010). Above pH 7, although some prefusion trimers are observed (Libersou et al., 2010), the majority of glycoproteins are flexible monomers (Albertini et al., 2012). At intermediate pH (between 6.5 and 7), the shape of the spikes is not homogeneous, and several forms of G are observed (Albertini et al., 2012). In some regions, G keeps its high pH organization while some spikes have already adopted the typical postfusion shape. Some elongated monomeric rod-shaped structures can also be observed (Albertini et al., 2012; Baquero et al., 2017). The sequential appearance of these species after lowering the pH suggested that VSV G structural transition occurs through monomeric intermediates.

Recently, a crystalline form of CHAV G_{th} has been obtained which contained four molecules in the asymmetric unit adopting two different conformations that were both distinct from the prefusion and postfusion protomer conformations (Baquero et al., 2017) (Figs. 6 and 7). The first conformation resembles VSV G prefusion protomer with one major difference: the R5 segment has already left the hydrophobic grooves it occupies in the prefusion conformation. Therefore, this conformation of CHAV G_{th} corresponds to an early intermediate (EI) on the transition pathway. In contrast, the second conformation of CHAV G_{th} in this crystal corresponds to a late intermediate (LI). It is already in an elongated hairpin although the refolding of segments R1, R4 and R5 is still incomplete. Those two structures suggest a plausible pathway for the conformational change which is detailed in Fig. 7.

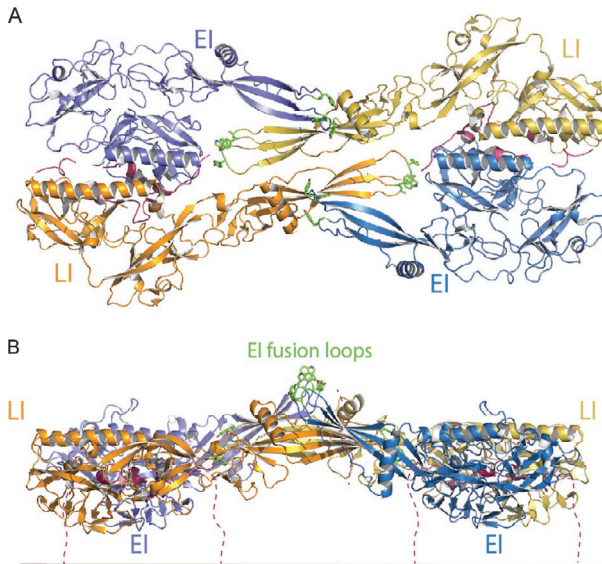


Fig. 6 Top (A) and lateral (B) views of the tetrameric assembly in the CHAV G_{th} crystal (PDB code: 5MDM). Protomers in the EI conformation are in blue shades. Protomers in the LI conformation are in yellowish shades. The residues in the fusion loops at the tip of the FD are in green sticks. In (B), the C-terminal segments which are linked to the transmembrane domain are depicted in dashed lines and the position of the membrane is indicated by the black line.

4.3.4 A role for dimers (or even tetramers) in vesiculovirus fusion?

In the crystal structure, two molecules of CHAV G_{th} EI and two molecules of G_{th} LI are assembled in a compact tetramer which forms a flat structure (Fig. 6) from which protrude the fusion loops of the two EI conformations (Baquero et al., 2017) (Fig. 6B). If such a structure would form at the viral surface, its orientation would optimally place those two loops to attack the target membrane while the two LI fusion loops would point toward the viral lipid bilayer.

In this crystalline tetrameric arrangement, the FDs are associated in an antiparallel manner which is stabilized by the formation of an intermolecular β -sheet between two EI and LI FDs, involving residues 75–80 in the EI strand (downstream the first G fusion loop) and 120–125 in the LI strand (downstream the second fusion loop) (Fig. 8). Remarkably, mutations of residues Asp121 and Glu123 were previously shown to affect the fusion properties of both VSV G (Fredericksen and Whitt, 1996) and VHSV G (Gaudin et al., 1999). Furthermore, for VSV G, a mutation in position 76 was shown to compensate for a deleterious mutation A117F in the fusion

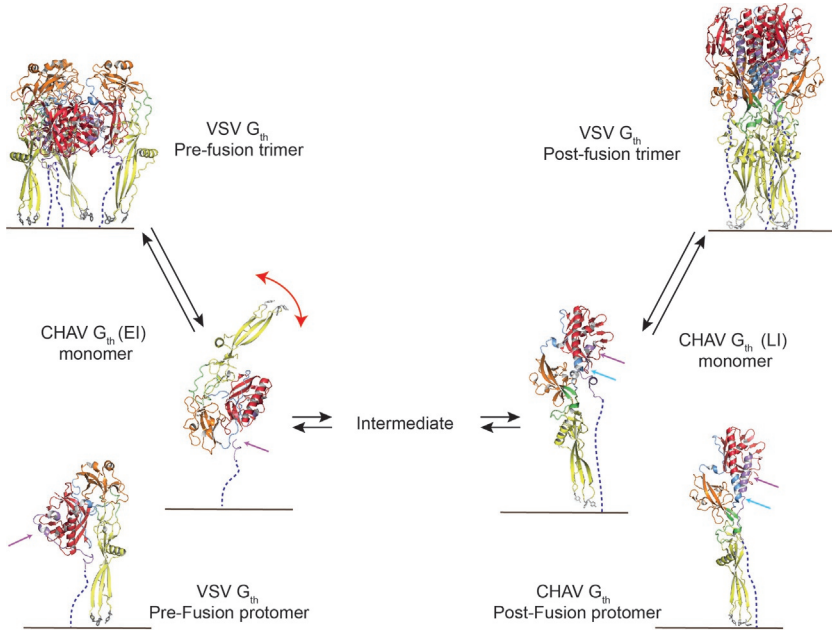


Fig. 7 Plausible pathway of vesiculovirus G conformational change. VSV G prefusion trimers dissociate into monomers. The R5 segment (indicated by purple arrows) leaves the hydrophobic grooves it occupied in the prefusion conformation to form the early intermediate state (EI). This confers orientational mobility to the rest of the molecule, even in the absence of any other conformational changes. Refolding of R2 and R3 and partial refolding of R1, R4 and R5 lead to the formation of the late intermediate state (LI) which resembles the postfusion protomer and is already in an elongated hairpin conformation. Final refolding of R1, R4 and R5 is required for retrimmerization in the postfusion conformation. G crystalline structures are represented as ribbon diagrams with the same color code than in Fig. 1.

loop (Stanifer et al., 2011). Those phenotypes, which could not be explained by the crystal structures of the pre- and postconformation, were much more easily interpreted in the context of this novel structure in which residues in positions 121 and 123 on the LI side of the intermolecular β -sheet are facing the conserved His 80 on the EI side. Indeed, the H80A mutation and the E123L/D121L double mutation, which both abolish VSV G fusion properties, were rescued by the same compensatory Q112P mutation. In a single FD, residue 112, being on the opposite side of the three-stranded β -sheet, is far from residues 121 and 123. However, in the tetrameric CHAV G_{th} crystal structure, it clusters with those residues (and His 80) on the same side of the intermolecular β -sheet (Baquero et al., 2017) (Fig. 8).

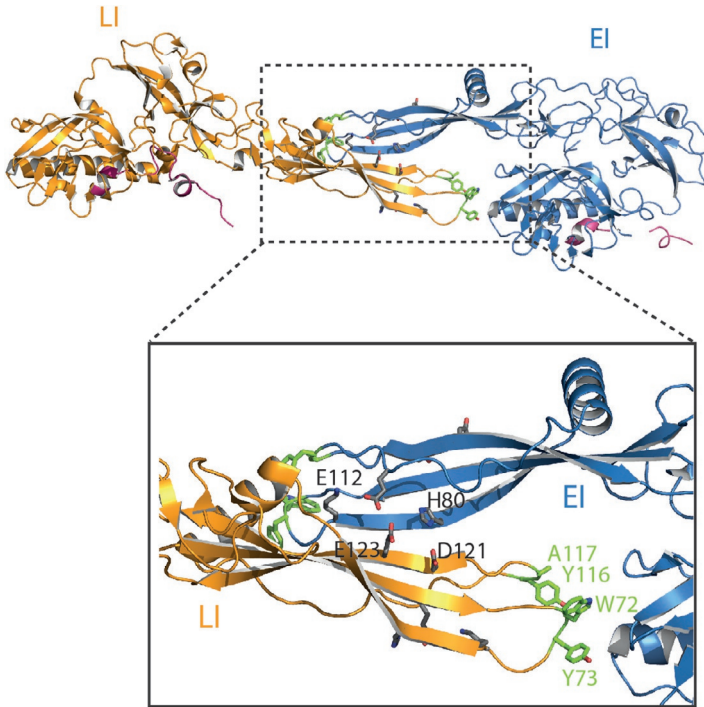


Fig. 8 Nontrimeric association of monomeric intermediate states of G. Close up view of the antiparallel β -sheet formed between EI (in blue) and LI (in yellow) FDs within the CHAV G_{th} crystal asymmetric unit. Key residues which cluster at the interface (see text) are represented in gray sticks. The residues in the fusion loops at the tip of the FD are in green sticks. Oxygen atoms are in red and nitrogen atoms in blue.

This strongly suggests that the antiparallel assembly of FDs found in CHAV G_{th} crystal is relevant for vesiculovirus fusion. Such an interaction might facilitate the insertion of the fusion loops of one protomer in the target membrane while the loops of the second attack the viral lipid bilayer.



5. Conclusions and perspectives

In recent years, our understanding of rhabdovirus entry into their host cell has considerably increased thanks to the work performed on RABV and VSV. However, besides those two model viruses, very little is known. Particularly, we know nothing about the receptors used by other rhabdoviruses for which the natural host and cellular targets are in most cases unidentified.

In terms of G structural biology, all our knowledge has been obtained on vesiculoviruses. The pathway of the structural transition, which does not correspond to what is proposed in the “unifying” classical model (Harrison, 2015), remains to be validated for other rhabdovirus genera (or for other class III viral fusion glycoproteins). Furthermore, these intermediates need to be observed during the fusion process when they interact with membranes.

Interestingly, neither a domain of G, nor a peptide has been shown to inhibit G refolding. This is in contrast with class I fusion glycoproteins, for which peptides corresponding to heptad repeats segments can inhibit the fusion process (Russell et al., 2001; Wild et al., 1994), and class II fusion glycoproteins, for which exogenously-added domain III can function as a dominant-negative fusion inhibitor (Liao and Kielian, 2005).

It is also worth noting that the TM domain of VSV G has been demonstrated to be involved at some stages of the transition from hemifusion toward complete fusion (Ci et al., 2018; Cleverley and Lenard, 1998). Therefore, structures of full length (i.e., including the TM domain) glycoproteins are necessary to complete our understanding of G-mediated membrane fusion.

Finally, both RABV G and VSV G are tools for researchers and in biotechnology. Indeed, RABV, thanks to RABV G properties, is the best tool available for transneuronal tracing and studies of monosynaptic connections (Ginger et al., 2013; Haberl et al., 2015). Nevertheless, a better understanding of RABV biology and its receptors is still needed to identify the limitations of those approaches (Albisetti et al., 2017). Similarly, VSV G is widely used for pseudotyping lentiviruses (Cronin et al., 2005; Matrai et al., 2010; Naldini et al., 1996) and VSV is a promising oncolytic virus for the treatment of cancer (Bishnoi et al., 2018; Durham et al., 2017; Fernandez et al., 2002; Hastie et al., 2013). The recent demonstration that it is possible to uncouple G receptor recognition and fusion activity paves the way to develop recombinant glycoproteins with modified tropism (Nikolic et al., 2018). As an example, a glycoprotein having (i) a point mutation that ablates the natural receptor tropism and (ii) an insertion of a protein domain targeting specifically a tumor cell antigen might allow the design of fully retargeted oncolytic VSVs. Such viruses should be able to eliminate cancerous cells while sparing normal ones. Here again, fundamental research is needed to demonstrate that VSV G can be fully functional in endocytic pathways which, depending on the targeted receptor, may not be clathrin-mediated.

References

- Abou-Hamdan, A., Belot, L., Albertini, A., Gaudin, Y., 2018. Monomeric intermediates formed by vesiculovirus glycoprotein during its low-pH-induced structural transition. *J. Mol. Biol.* 430 (12), 1685–1695.
- Albertini, A.A., Merigoux, C., Libersou, S., Mадiona, K., Bressanelli, S., Roche, S., Lepault, J., Melki, R., Vachette, P., Gaudin, Y., 2012. Characterization of monomeric intermediates during VSV glycoprotein structural transition. *PLoS Pathog.* 8 (2) e1002556.
- Albisetti, G.W., Ghanem, A., Foster, E., Conzelmann, K.K., Zeilhofer, H.U., Wildner, H., 2017. Identification of two classes of somatosensory neurons that display resistance to retrograde infection by rabies virus. *J. Neurosci.* 37 (43), 10358–10371.
- Amirache, F., Levy, C., Costa, C., Mangeot, P.E., Torbett, B.E., Wang, C.X., Negre, D., Cosset, F.L., Verhoeven, E., 2014. Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* 123 (9), 1422–1424.
- Backovic, M., Longnecker, R., Jardetzky, T.S., 2009. Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (8), 2880–2885.
- Baquero, E., Albertini, A.A., Gaudin, Y., 2015a. Recent mechanistic and structural insights on class III viral fusion glycoproteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 33, 52–60.
- Baquero, E., Albertini, A.A., Raux, H., Buonocore, L., Rose, J.K., Bressanelli, S., Gaudin, Y., 2015b. Structure of the low pH conformation of Chandipura virus G reveals important features in the evolution of the vesiculovirus glycoprotein. *PLoS Pathog.* 11 (3), e1004756.
- Baquero, E., Albertini, A.A., Raux, H., Abou-Hamdan, A., Boeri-Erba, E., Ouldali, M., Buonocore, L., Rose, J.K., Lepault, J., Bressanelli, S., Gaudin, Y., 2017. Structural intermediates in the fusion-associated transition of vesiculovirus glycoprotein. *EMBO J.* 36 (5), 679–692.
- Bearzotti, M., Delmas, B., Lamoureux, A., Loustau, A.M., Chilmonczyk, S., Bremont, M., 1999. Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *J. Virol.* 73 (9), 7703–7709.
- Beglova, N., Blacklow, S.C., 2005. The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem. Sci.* 30 (6), 309–317.
- Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A., Lafay, F., 1991. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 65 (8), 4198–4203.
- Bishnoi, S., Tiwari, R., Gupta, S., Byrareddy, S.N., Nayak, D., 2018. Oncotargeting by vesicular stomatitis virus (VSV): advances in cancer therapy. *Viruses* 10 (2), e90.
- Blasdel, K.R., Voysey, R., Bulach, D., Joubert, D.A., Tesh, R.B., Boyle, D.B., Walker, P.J., 2012. Kotonkan and Obodhiang viruses: African ephemeroviruses with large and complex genomes. *Virology* 425 (2), 143–153.
- Bloor, S., Maelfait, J., Krumbach, R., Beyaert, R., Randow, F., 2010. Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is essential for infection with vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (15), 6970–6975.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232 (4746), 34–47.
- Bu, G., Marzolo, M.P., 2000. Role of rap in the biogenesis of lipoprotein receptors. *Trends Cardiovasc. Med.* 10 (4), 148–155.
- Burke, H.G., Heldwein, E.E., 2015. Crystal structure of the human cytomegalovirus glycoprotein B. *PLoS Pathog.* 11 (10), e1005227.
- Burrage, T.G., Tignor, G.H., Smith, A.L., 1985. Rabies virus binding at neuromuscular junctions. *Virus Res.* 2 (3), 273–289.
- Carneiro, F.A., Stauffer, F., Lima, C.S., Juliano, M.A., Juliano, L., Da Poian, A.T., 2003. Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation. *J. Biol. Chem.* 278 (16), 13789–13794.

- Carr, C.M., Chaudhry, C., Kim, P.S., 1997. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (26), 14306–14313.
- Castellanos, J.E., Castaneda, D.R., Velandia, A.E., Hurtado, H., 1997. Partial inhibition of the *in vitro* infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons by rabies virus using nicotinic antagonists. *Neurosci. Lett.* 229 (3), 198–200.
- Chandramouli, S., Ciferri, C., Nikitin, P.A., Calo, S., Gerrein, R., Balabanis, K., Monroe, J., Hebner, C., Lilja, A.E., Settembre, E.C., Carfi, A., 2015. Structure of HCMV glycoprotein B in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody. *Nat. Commun.* 6, 8176.
- Cheng, C.Y., Shih, W.L., Huang, W.R., Chi, P.I., Wu, M.H., Liu, H.J., 2012. Bovine ephemeral fever virus uses a clathrin-mediated and dynamin 2-dependent endocytosis pathway that requires Rab5 and Rab7 as well as microtubules. *J. Virol.* 86 (24), 13653–13661.
- Chernomordik, L.V., Kozlov, M.M., 2005. Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell* 123 (3), 375–382.
- Chernomordik, L., Kozlov, M.M., Zimmerberg, J., 1995. Lipids in biological membrane fusion. *J. Membr. Biol.* 146 (1), 1–14.
- Chernomordik, L.V., Frolov, V.A., Leikina, E., Bronk, P., Zimmerberg, J., 1998. The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J. Cell Biol.* 140 (6), 1369–1382.
- Ci, Y., Yang, Y., Xu, C., Shi, L., 2018. Vesicular stomatitis virus G protein transmembrane region is crucial for the hemi-fusion to full fusion transition. *Sci. Rep.* 8 (1), 10669.
- Clague, M.J., Schoch, C., Zech, L., Blumenthal, R., 1990. Gating kinetics of pH-activated membrane fusion of vesicular stomatitis virus with cells: stopped-flow measurements by dequenching of octadecylrhodamine fluorescence. *Biochemistry* 29 (5), 1303–1308.
- Cleverley, D.Z., Lenard, J., 1998. The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (7), 3425–3430.
- Cohen, F.S., Melikyan, G.B., 2004. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J. Membr. Biol.* 199 (1), 1–14.
- Coil, D.A., Miller, A.D., 2004. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 78 (20), 10920–10926.
- Conti, C., Superti, F., Tsiang, H., 1986. Membrane carbohydrate requirement for rabies virus binding to chicken embryo related cells. *Intervirology* 26 (3), 164–168.
- Coulon, P., Ternaux, J.P., Flamand, A., Tuffereau, C., 1998. An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* 72 (1), 273–278.
- Crimmins, D.L., Mehard, W.B., Schlesinger, S., 1983. Physical properties of a soluble form of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus at neutral and acidic pH. *Biochemistry* 22 (25), 5790–5796.
- Cronin, J., Zhang, X.Y., Reiser, J., 2005. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* 5 (4), 387–398.
- Cureton, D.K., Massol, R.H., Saffarian, S., Kirchhausen, T.L., Whelan, S.P., 2009. Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS Pathog.* 5 (4), e1000394.
- Cureton, D.K., Massol, R.H., Whelan, S.P., Kirchhausen, T., 2010. The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Pathog.* 6 (9), e1001127.
- Dietzgen, R.G., Kondo, H., Goodin, M.M., Kurath, G., Vasilakis, N., 2017. The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Res.* 227, 158–170.

- Dietzschold, B., Gore, M., Marchadier, D., Niu, H.S., Bunschoten, H.M., Otvos Jr., L., Wunner, W.H., Ertl, H.C., Osterhaus, A.D., Koprowski, H., 1990. Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J. Virol.* 64 (8), 3804–3809.
- Doms, R.W., Keller, D.S., Helenius, A., Balch, W.E., 1987. Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *J. Cell Biol.* 105 (5), 1957–1969.
- Durham, N.M., Mulgrew, K., McGlinchey, K., Monks, N.R., Ji, H., Herbst, R., Suzich, J., Hammond, S.A., Kelly, E.J., 2017. Oncolytic VSV primes differential responses to immuno-oncology therapy. *Mol. Ther.* 25 (8), 1917–1932.
- Edson, M.A., Lin, Y.N., Matzuk, M.M., 2010. Deletion of the novel oocyte-enriched gene, *Gpr149*, leads to increased fertility in mice. *Endocrinology* 151 (1), 358–368.
- Efrat, A., Chernomordik, L.V., Kozlov, M.M., 2007. Point-like protrusion as a prestalk intermediate in membrane fusion pathway. *Biophys. J.* 92 (8), L61–L63.
- Fallahi, F., Wandeler, A.L., Nadin-Davis, S.A., 2016. Characterization of epitopes on the rabies virus glycoprotein by selection and analysis of escape mutants. *Virus Res.* 220, 161–171.
- Ferlin, A., Raux, H., Baquero, E., Lepault, J., Gaudin, Y., 2014. Characterization of pH-sensitive molecular switches that trigger the structural transition of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the postfusion state toward the prefusion state. *J. Virol.* 88 (22), 13396–13409.
- Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D., Barber, G.N., 2002. Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *J. Virol.* 76 (2), 895–904.
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., Rubinstein, M., 2013. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (18), 7306–7311.
- Flamand, A., Raux, H., Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., 1993. Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology* 194 (1), 302–313.
- Fredericksen, B.L., Whitt, M.A., 1996. Mutations at two conserved acidic amino acids in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect pH-dependent conformational changes and reduce the pH threshold for membrane fusion. *Virology* 217 (1), 49–57.
- Garry, C.E., Garry, R.F., 2009. Proteomics computational analyses suggest that the bornavirus glycoprotein is a class III viral fusion protein (gamma penetrene). *Virol. J.* 6, 145.
- Gastka, M., Horvath, J., Lentz, T.L., 1996. Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt. 10), 2437–2440.
- Gaudin, Y., 1997. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *J. Virol.* 71 (5), 3742–3750.
- Gaudin, Y., 2000a. Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *J. Cell Biol.* 150 (3), 601–612.
- Gaudin, Y., 2000b. Reversibility in fusion protein conformational changes. The intriguing case of rhabdovirus-induced membrane fusion. *Subcell. Biochem.* 34, 379–408.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Segretain, D., Knossow, M., Flamand, A., 1991. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 65 (9), 4853–4859.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., Knossow, M., Flamand, A., 1993. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J. Virol.* 67 (3), 1365–1372.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Flamand, A., Ruigrok, R.W., 1995. Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. *J. Virol.* 69 (9), 5528–5534.

- Gaudin, Y., Raux, H., Flamand, A., Ruigrok, R.W., 1996. Identification of amino acids controlling the low-pH-induced conformational change of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 70 (11), 7371–7378.
- Gaudin, Y., de Kinkelin, P., Benmansour, A., 1999. Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt. 5), 1221–1229.
- Ge, P., Tsao, J., Schein, S., Green, T.J., Luo, M., Zhou, Z.H., 2010. Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science* 327 (5966), 689–693.
- Ginger, M., Haberl, M., Conzelmann, K.K., Schwarz, M.K., Frick, A., 2013. Revealing the secrets of neuronal circuits with recombinant rabies virus technology. *Front. Neural Circuits* 7, 2.
- Gluska, S., Zahavi, E.E., Chein, M., Gradus, T., Bauer, A., Finke, S., Perlson, E., 2014. Rabies virus hijacks and accelerates the p75NTR retrograde axonal transport machinery. *PLoS Pathog.* 10 (8), e1004348.
- Guo, Y., Duan, M., Wang, X., Gao, J., Guan, Z., Zhang, M., 2019. Early events in rabies virus infection—attachment, entry, and intracellular trafficking. *Virus Res.* 263, 217–225.
- Haberl, M.G., Viana da Silva, S., Guest, J.M., Ginger, M., Ghanem, A., Mülle, C., Oberlaender, M., Conzelmann, K.K., Frick, A., 2015. An anterograde rabies virus vector for high-resolution large-scale reconstruction of 3D neuron morphology. *Brain Struct. Funct.* 220 (3), 1369–1379.
- Hammond, C., Helenius, A., 1994. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science* 266 (5184), 456–458.
- Harrison, S.C., 2015. Viral membrane fusion. *Virology* 479–480, 498–507.
- Hastie, E., Cataldi, M., Marriott, I., Grdzlishvili, V.Z., 2013. Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* 176 (1–2), 16–32.
- Heldwein, E.E., Lou, H., Bender, F.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Harrison, S.C., 2006. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313 (5784), 217–220.
- Herrmann, A., Clague, M.J., Puri, A., Morris, S.J., Blumenthal, R., Grimaldi, S., 1990. Effect of erythrocyte transbilayer phospholipid distribution on fusion with vesicular stomatitis virus. *Biochemistry* 29 (17), 4054–4058.
- Johannsdottir, H.K., Mancini, R., Kartenbeck, J., Amato, L., Helenius, A., 2009. Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J. Virol.* 83 (1), 440–453.
- Kadlec, J., Loureiro, S., Abrescia, N.G., Stuart, D.I., Jones, I.M., 2008. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (10), 1024–1030.
- Kim, I.S., Jenni, S., Stanifer, M.L., Roth, E., Whelan, S.P., van Oijen, A.M., Harrison, S.C., 2017. Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (1), E28–E36.
- Klingen, Y., Conzelmann, K.K., Finke, S., 2008. Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport. *J. Virol.* 82 (1), 237–245.
- Kuzmin, P.I., Zimmerberg, J., Chizmadzhev, Y.A., Cohen, F.S., 2001. A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (13), 7235–7240.
- Lafay, F., Coulon, P., Astic, L., Saucier, D., Riche, D., Holley, A., Flamand, A., 1991. Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. *Virology* 183 (1), 320–330.
- Lafay, F., Benmansour, A., Chebli, K., Flamand, A., 1996. Immunodominant epitopes defined by a yeast-expressed library of random fragments of the rabies virus glycoprotein map outside major antigenic sites. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt. 2), 339–346.

- Lafon, M., Wiktor, T.J., Macfarlan, R.I., 1983. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 64 (Pt. 4), 843–851.
- Le Blanc, I., Luyet, P.P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demaurex, N., Faure, J., Sadoul, R., Parton, R.G., Gruenberg, J., 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat. Cell Biol.* 7 (7), 653–664.
- Lee, J., Lentz, B.R., 1998. Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (16), 9274–9279.
- Lee, A.S., Burdeinick-Kerr, R., Whelan, S.P., 2014. A genome-wide small interfering RNA screen identifies host factors required for vesicular stomatitis virus infection. *J. Virol.* 88 (15), 8355–8360.
- Lentz, T.L., Burrage, T.G., Smith, A.L., Crick, J., Tignor, G.H., 1982. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 215 (4529), 182–184.
- Lentz, T.L., Wilson, P.T., Hawrot, E., Speicher, D.W., 1984. Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. *Science* 226 (4676), 847–848.
- Lentz, T.L., Benson, R.J., Klimowicz, D., Wilson, P.T., Hawrot, E., 1986. Binding of rabies virus to purified Torpedo acetylcholine receptor. *Brain Res.* 387 (3), 211–219.
- Lewis, P., Lentz, T.L., 1998. Rabies virus entry into cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurocytol.* 27 (8), 559–573.
- Lewis, P., Fu, Y., Lentz, T.L., 1998. Rabies virus entry into endosomes in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Exp. Neurol.* 153 (1), 65–73.
- Liao, M., Kielian, M., 2005. Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. *J. Cell Biol.* 171, 111–120.
- Libersou, S., Albertini, A.A., Ouldali, M., Maury, V., Maheu, C., Raux, H., de Haas, F., Roche, S., Gaudin, Y., Lepault, J., 2010. Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion. *J. Cell Biol.* 191 (1), 199–210.
- Liu, H., Liu, Y., Liu, S., Pang, D.W., Xiao, G., 2011. Clathrin-mediated endocytosis in living host cells visualized through quantum dot labeling of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Virol.* 85 (13), 6252–6262.
- Luo, L.H., Li, Y., Snyder, R.M., Wagner, R.R., 1988. Point mutations in glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) selected by resistance to neutralization by epitope-specific monoclonal antibodies. *Virology* 163 (2), 341–348.
- Luyet, P.P., Falguieres, T., Pons, V., Pattnaik, A.K., Gruenberg, J., 2008. The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA. *Traffic* 9 (12), 2279–2290.
- Lyles, D.S., Varela, V.A., Parce, J.W., 1990. Dynamic nature of the quaternary structure of the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* 29 (10), 2442–2449.
- Lyles, D.S., McKenzie, M., Parce, J.W., 1992. Subunit interactions of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral matrix protein. *J. Virol.* 66 (1), 349–358.
- Marsh, M., Helenius, A., 2006. Virus entry: open sesame. *Cell* 124 (4), 729–740.
- Mathieu, M.E., Grigera, P.R., Helenius, A., Wagner, R.R., 1996. Folding, unfolding, and refolding of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Biochemistry* 35 (13), 4084–4093.
- Matrai, J., Chuah, M.K., VandenDriessche, T., 2010. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol. Ther.* 18 (3), 477–490.
- Mazarakis, N.D., Azzouz, M., Rohll, J.B., Ellard, F.M., Wilkes, F.J., Olsen, A.L., Carter, E.E., Barber, R.D., Baban, D.F., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J., O'Malley, K., Mitrophanous, K.A., 2001. Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum. Mol. Genet.* 10 (19), 2109–2121.
- McGehee, D.S., Role, L.W., 1995. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 521–546.

- Mire, C.E., White, J.M., Whitt, M.A., 2010. A spatio-temporal analysis of matrix protein and nucleocapsid trafficking during vesicular stomatitis virus uncoating. *PLoS Pathog.* 6 (7), e1000994.
- Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N., Robinson, M.S., 2003. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* 162 (5), 909–918.
- Munis, A.M., Tijani, M., Hassall, M., Mattiuzzo, G., Collins, M.K., Takeuchi, Y., 2018. Characterization of antibody interactions with the G protein of vesicular stomatitis virus Indiana strain and other vesiculovirus G proteins. *J. Virol.* 92 (23), pii: e00900-18.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., Trono, D., 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272 (5259), 263–267.
- Nikolic, J., Belot, L., Raux, H., Legrand, P., Gaudin, Y., Albertini, A.A., 2018. Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nat. Commun.* 9 (1), 1029.
- Ohishi, H., Shigemoto, R., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1993. Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 53 (4), 1009–1018.
- Pak, C.C., Puri, A., Blumenthal, R., 1997. Conformational changes and fusion activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein: [125I]iodonaphthyl azide photolabeling studies in biological membranes. *Biochemistry* 36 (29), 8890–8896.
- Pasqual, G., Rojek, J.M., Masin, M., Chatton, J.Y., Kunz, S., 2011. Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport. *PLoS Pathog.* 7 (9), e1002232.
- Peng, R., Zhang, S., Cui, Y., Shi, Y., Gao, G.F., Qi, J., 2017. Structures of human-infecting Thogotovirus fusogens support a common ancestor with insect baculovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (42), E8905–E8912.
- Piccinotti, S., Whelan, S.P., 2016. Rabies internalizes into primary peripheral neurons via clathrin coated pits and requires fusion at the cell body. *PLoS Pathog.* 12 (7), e1005753.
- Piccinotti, S., Kirchhausen, T., Whelan, S.P., 2013. Uptake of rabies virus into epithelial cells by clathrin-mediated endocytosis depends upon actin. *J. Virol.* 87 (21), 11637–11647.
- Prehaud, C., Coulon, P., LaFay, F., Thiers, C., Flamand, A., 1988. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J. Virol.* 62 (1), 1–7.
- Prehaud, C., Wolff, N., Terrien, E., Lafage, M., Megret, F., Babault, N., Cordier, F., Tan, G.S., Maitrepierre, E., Menager, P., Choppy, D., Hoos, S., England, P., Delepierre, M., Schnell, M.J., Buc, H., Lafon, M., 2010. Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci. Signal.* 3 (105), ra5.
- Puri, A., Winick, J., Lowy, R.J., Covell, D., Eidelman, O., Walter, A., Blumenthal, R., 1988. Activation of vesicular stomatitis virus fusion with cells by pretreatment at low pH. *J. Biol. Chem.* 263 (10), 4749–4753.
- Puri, A., Grimaldi, S., Blumenthal, R., 1992. Role of viral envelope sialic acid in membrane fusion mediated by the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* 31 (41), 10108–10113.
- Raux, H., Coulon, P., Lafay, F., Flamand, A., 1995. Monoclonal antibodies which recognize the acidic configuration of the rabies glycoprotein at the surface of the virion can be neutralizing. *Virology* 210 (2), 400–408.
- Reiter, R.E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M.M., Loda, M., Witte, O.N., 1998. Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (4), 1735–1740.
- Roche, S., Gaudin, Y., 2002. Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology* 297 (1), 128–135.

- Roche, S., Gaudin, Y., 2004. Evidence that rabies virus forms different kinds of fusion machines with different pH thresholds for fusion. *J. Virol.* 78 (16), 8746–8752.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F.A., Gaudin, Y., 2006. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 313 (5784), 187–191.
- Roche, S., Rey, F.A., Gaudin, Y., Bressanelli, S., 2007. Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 315 (5813), 843–848.
- Roche, S., Albertini, A.A., Lepault, J., Bressanelli, S., Gaudin, Y., 2008. Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (11), 1716–1728.
- Roth, S.L., Whittaker, G.R., 2011. Promotion of vesicular stomatitis virus fusion by the endosome-specific phospholipid bis(monoacylglycero)phosphate (BMP). *FEBS Lett.* 585 (6), 865–869.
- Rubinstein, M., 2018. Is Lgr4 essential for VSV- and VSV-G-pseudotyped lentiviral vector entry to cells? *J. Biol. Chem.* 293 (1), 112.
- Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Deisenhofer, J., 2002. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* 298 (5602), 2353–2358.
- Russell, C.J., Jardetzky, T.S., Lamb, R.A., 2001. Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *EMBO J.* 20, 4024–4034.
- Schlegel, R., Tralka, T.S., Willingham, M.C., Pastan, I., 1983. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* 32 (2), 639–646.
- Seif, I., Coulon, P., Rollin, P.E., Flamand, A., 1985. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* 53 (3), 926–934.
- Shao, L., Zhao, J., Zhang, H., 2016. Spring viraemia of carp virus enters grass carp ovary cells via clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis. *J. Gen. Virol.* 97 (11), 2824–2836.
- Si, Z., Zhang, J., Shivakoti, S., Atanasov, I., Tao, C.L., Hui, W.H., Zhou, K., Yu, X., Li, W., Luo, M., Bi, G.Q., Zhou, Z.H., 2018. Different functional states of fusion protein gB revealed on human cytomegalovirus by cryo electron tomography with Volta phase plate. *PLoS Pathog.* 14 (12), e1007452.
- Sieczkarski, S.B., Whittaker, G.R., 2003. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic* 4 (5), 333–343.
- Sinibaldi, L., Goldoni, P., Seganti, L., Superti, F., Tsiang, H., Orsi, N., 1985. Gangliosides in early interactions between vesicular stomatitis virus and CER cells. *Microbiologica* 8 (4), 355–365.
- Stanifer, M.L., Cureton, D.K., Whelan, S.P., 2011. A recombinant vesicular stomatitis virus bearing a lethal mutation in the glycoprotein gene uncovers a second site suppressor that restores fusion. *J. Virol.* 85 (16), 8105–8115.
- Sun, X., Yau, V.K., Briggs, B.J., Whittaker, G.R., 2005. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338 (1), 53–60.
- Sun, X., Belouzard, S., Whittaker, G.R., 2008. Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein. *J. Biol. Chem.* 283 (10), 6418–6427.
- Superti, F., Derer, M., Tsiang, H., 1984a. Mechanism of rabies virus entry into CER cells. *J. Gen. Virol.* 65 (Pt. 4), 781–789.
- Superti, F., Seganti, L., Tsiang, H., Orsi, N., 1984b. Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to CER cells. Brief report. *Arch. Virol.* 81 (3–4), 321–328.
- Superti, F., Hauttecoeur, B., Morelec, M.J., Goldoni, P., Bizzini, B., Tsiang, H., 1986. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J. Gen. Virol.* 67 (Pt. 1), 47–56.

- Superti, F., Seganti, L., Ruggeri, F.M., Tinari, A., Donelli, G., Orsi, N., 1987. Entry pathway of vesicular stomatitis virus into different host cells. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt. 2), 387–399.
- Thoulouze, M.I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H., Lafon, M., 1998. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J. Virol.* 72 (9), 7181–7190.
- Tuffereau, C., Leblois, H., Benejean, J., Coulon, P., Lafay, F., Flamand, A., 1989. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* 172 (1), 206–212.
- Tuffereau, C., Benejean, J., Blondel, D., Kieffer, B., Flamand, A., 1998. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 17 (24), 7250–7259.
- Tuffereau, C., Desmezieres, E., Benejean, J., Jallet, C., Flamand, A., Tordo, N., Perrin, P., 2001. Interaction of lyssaviruses with the low-affinity nerve-growth factor receptor p75NTR. *J. Gen. Virol.* 82 (Pt. 12), 2861–2867.
- Tuffereau, C., Schmidt, K., Langevin, C., Lafay, F., Dechant, G., Koltzenburg, M., 2007. The rabies virus glycoprotein receptor p75NTR is not essential for rabies virus infection. *J. Virol.* 81 (24), 13622–13630.
- Vandepol, S.B., Lefrancois, L., Holland, J.J., 1986. Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* 148 (2), 312–325.
- Walker, P.J., Firth, C., Widen, S.G., Blasdel, K.R., Guzman, H., Wood, T.G., Paradkar, P.N., Holmes, E.C., Tesh, R.B., Vasilakis, N., 2015. Evolution of genome size and complexity in the Rhabdoviridae. *PLoS Pathog.* 11 (2), e1004664.
- Walker, P.J., Blasdel, K.R., Calisher, C.H., Dietzgen, R.G., Kondo, H., Kurath, G., Longdon, B., Stone, D.M., Tesh, R.B., Tordo, N., Vasilakis, N., Whitfield, A.E., Ictv Report, C., 2018. ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae. *J. Gen. Virol.* 99 (4), 447–448.
- Wang, J., Wang, Z., Liu, R., Shuai, L., Wang, X., Luo, J., Wang, C., Chen, W., Wang, X., Ge, J., He, X., Wen, Z., Bu, Z., 2018. Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus. *PLoS Pathog.* 14 (7) e1007189.
- Weekes, M.P., Antrobus, R., Talbot, S., Hor, S., Simecek, N., Smith, D.L., Bloor, S., Randow, F., Lehner, P.J., 2012. Proteomic plasma membrane profiling reveals an essential role for gp96 in the cell surface expression of LDLR family members, including the LDL receptor and LRP6. *J. Proteome Res.* 11 (3), 1475–1484.
- Wild, C.T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B., Matthews, T.J., 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9770–9774.
- Willnow, T.E., 1998. Receptor-associated protein (RAP): a specialized chaperone for endocytic receptors. *Biol. Chem.* 379 (8–9), 1025–1031.
- Wimley, W.C., White, S.H., 1992. Partitioning of tryptophan side-chain analogs between water and cyclohexane. *Biochemistry* 31 (51), 12813–12818.
- Yamada, S., Ohnishi, S., 1986. Vesicular stomatitis virus binds and fuses with phospholipid domain in target cell membranes. *Biochemistry* 25 (12), 3703–3708.
- Zagouras, P., Ruusala, A., Rose, J.K., 1991. Dissociation and reassociation of oligomeric viral glycoprotein subunits in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 65 (4), 1976–1984.
- Zaitseva, E., Mittal, A., Griffin, D.E., Chernomordik, L.V., 2005. Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins. *J. Cell Biol.* 169 (1), 167–177.
- Zhang, N., Huang, H., Tan, B., Wei, Y., Xiong, Q., Yan, Y., Hou, L., Wu, N., Siwko, S., Cimarelli, A., Xu, J., Han, H., Qian, M., Liu, M., Du, B., 2017. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 facilitates vesicular stomatitis virus infection by binding vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 292 (40), 16527–16538.



Monomeric Intermediates Formed by Vesiculovirus Glycoprotein during Its Low-pH-induced Structural Transition

Abbas Abou-Hamdan, Laura Belot, Aurélie Albertini and Yves Gaudin

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

Correspondence to Yves Gaudin: yves.gaudin@i2bc.paris-saclay.fr
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.015>

Edited by P-Y Lozach

Abstract

Vesiculoviruses enter cells by membrane fusion, driven by a large, low-pH-induced, conformational change in the fusion glycoprotein (G) that involves transition from a trimeric pre-fusion to a trimeric post-fusion state. G is the model of class III fusion glycoproteins which also includes the fusion glycoproteins of herpesviruses (gB) and baculoviruses (gp64). Class III fusion proteins combine features of the previously characterized class I and class II fusion proteins. In this review, we first present and discuss the data that indicate that the Vesiculovirus G structural transition proceeds through monomeric intermediates. Then, we focus on a recently determined crystal structure of the Chandipura virus G ectodomain that contained two monomeric intermediate conformations of the glycoprotein, revealing the chronological order of the structural changes in the protein and offering a detailed pathway for the conformational change, in agreement with electron microscopy data. In the crystal, the intermediates were associated through their fusion domain in an antiparallel manner to form an intermolecular β -sheet. Mutagenesis indicated that this interface is functionally relevant. All those structural data challenge the current model proposed for viral membrane fusion. Therefore, we wonder if this mode of operating is specific to Vesiculovirus G and discuss data indicating that class II fusion glycoproteins are monomeric when they interact with the target membrane but also crystal structures suggesting the existence of non-trimeric intermediates for influenza hemagglutinin which is the prototype of class I fusion proteins.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The Vesiculovirus genus is one of the six genera of the rhabdovirus family. The prototype vesiculovirus is vesicular stomatitis virus (VSV). It is an arbovirus that can infect insects, cattle, horses and pigs. In mammals, its ability to preferentially infect and kill tumor cells makes it a promising oncolytic virus for the treatment of cancer [1–3]. Although VSV-associated disease is generally benign, other vesiculoviruses can be deadly to humans. This is the case for the Chandipura virus (CHAV), which is an emerging human pathogen associated with deadly encephalitis, principally affecting children in the tropical areas of India and which has, in recent years, caused several outbreaks with high mortality rates [4].

As all rhabdoviruses, vesiculoviruses are enveloped viruses having a rigid bullet shape with a flat base and

a round tip. Their genome encodes five structural proteins including a single transmembrane glycoprotein (G). G is a type I membrane glycoprotein. After cleavage of the amino-terminal signal peptide, the mature glycoprotein is about 500 amino acids long (495 for VSV G). The bulk of the mass of G is located outside the viral membrane and constitutes the amino-terminal ectodomain. G is anchored in the membrane by a single α -helical transmembrane segment. The small intraviral domain is probably involved in interactions with internal proteins. G plays a critical role during the initial steps of virus infection [5]. First, it is responsible for virus attachment to specific receptors, which, in the case of VSV G, are the members of the low-density lipoprotein receptor family [6,7]. After binding, virions enter the cell by a clathrin-mediated endocytic pathway [8,9]. In the acidic environment of the endocytic vesicle, G triggers the fusion between

the viral and endosomal membranes, which releases the genome in the cytosol for the subsequent steps of infection [5]. Fusion is catalyzed by a low-pH-induced large structural transition from a pre- to a post-fusion conformation which are both trimeric [10]. Remarkably, for rhabdoviruses, the structural transition is reversible [11–14], and in fact, there is an equilibrium between different states of G, which is shifted toward the trimeric post-fusion conformation at low pH [5,15].

VSV G structure reveals an organization distinct from both class I fusion glycoproteins, such as the influenza virus hemagglutinin (HA) and the paramyxovirus fusion protein (F), and class II fusion glycoproteins of several positive strand RNA viruses, such as the E protein of flaviviruses and E1 of alphaviruses, and of the bunyaviridae family [16]. In fact, together with baculovirus gp64 [17], herpesviruses gB [18–21] and thogotovirus Gp [22], rhabdovirus G defines the class III of fusion proteins [23]. VSV G is the only member of this class for which high-resolution structures of both the pre- and post-fusion states are available [24,25]. Low-resolution electron microscopy (EM) structures of the putative pre-fusion state of HSV1 gB have been obtained [26,27], but those structures have led to opposite interpretations concerning the orientation of the fusion domains (FDs) either pointing away or toward the anchoring membrane. Nevertheless, the localization of monoclonal antibodies binding sites [26] and spectroscopic characterization of functional fluorescent gB [28] are consistent with a model of pre-fusion gB similar to the pre-fusion VSV G crystal structure [25] (i.e., with the fusion loops pointing toward the anchoring membrane).

Similar to other class III proteins, the polypeptide chain of the G ectodomain folds into three distinct domains termed the FD, the pleckstrin homology domain (PHD) and the trimerization domain (TrD) [23] (Fig. 1). The FD is an extended β -sheet structure at the tip of which are located the two hydrophobic fusion loops that interact with the target membrane to initiate the fusion process. This organization of the class III FD is reminiscent of that of class II fusion proteins. The TrD comprises an α -helix involved in the trimerization of the glycoprotein and a β -sheet-rich region connected to the C-terminal segment of the ectodomain.

During the structural transition, the FD, the PHD and the TrD retain their tertiary structure. Nevertheless, they undergo large rearrangements in their relative orientation due to secondary changes in hinge segments (R1 to R5) which refold during the low-pH induced conformational change. Particularly, in the post-fusion state, the core of the trimer is made by the three TrD central helices (extended by the refolding of segment R4) whose grooves accommodate three lateral helices resulting in the refolding of R5 (Fig. 1). This six-helix bundle organization is very

similar to that of the trimeric core of the post-fusion state of some class I fusion glycoproteins such as HIV-1 gp41 or Ebola gp2 [29,30].

In this review, we will present the recent crystalline structures of monomeric intermediates [31] obtained for CHAV G ectodomain and how they fit with numerous historical articles showing the existence of G monomers. We will also discuss the ability of G monomers to form flat antiparallel dimers and the experimental data indicating that those dimers play a role during the fusion process [31]. Finally, we will discuss if this mode of operating is specific to Vesiculovirus glycoproteins. Particularly, we will review EM data indicating that the initial interaction between class II fusion glycoproteins and the target membrane is mediated by monomers and examine some non-trimeric structures of influenza hemagglutinin present in the Protein Data Bank (PDB) but whose oligomerization state and protomer conformation have never been discussed thoroughly before.

Monomeric states of VSV G

The first attempt to characterize the oligomeric status of VSV G revealed that a soluble ectodomain obtained by treatment of virions with cathepsin D is monomeric at high pH [32]. Later, it was shown that G solubilized from membranes with detergent behaves as a monomer at high pH whereas it forms a stable trimer at low pH [11]. In addition, the existence of a thermodynamic equilibrium between monomers and trimers of VSV G solubilized by octylglucoside was demonstrated [33]. This equilibrium was also demonstrated to exist *in vivo* [34,35]. From those pioneering works, it was clear that VSV G trimer was much less stable than HA trimer, which was the best characterized viral fusion glycoprotein at that time [36].

The behavior of VSV G_{th} (residues 1–422, generated by thermolysin-limited proteolysis of viral particles in solution, which has been crystallized) was further characterized using several biophysical techniques, including analytical ultracentrifugation, circular dichroism, EM and small angle X-ray scattering. While the post-fusion trimer was the major species detected at low pH, the pre-fusion trimer was never detected in solution. Indeed, at high pH, G_{th} appeared to be a flexible monomer exploring a large conformational space and adopting more elongated conformations when pH decreases [37].

The oligomeric status of VSV G has also been analyzed at the surface of the viral particle by EM and tomography. Below pH 6, the only structure which is observed is the trimeric post-fusion state which has a tendency to reorganize into regular arrays [38]. Above pH 7, although few pre-fusion trimers are observed [38], the vast majority seems to be flexible monomers

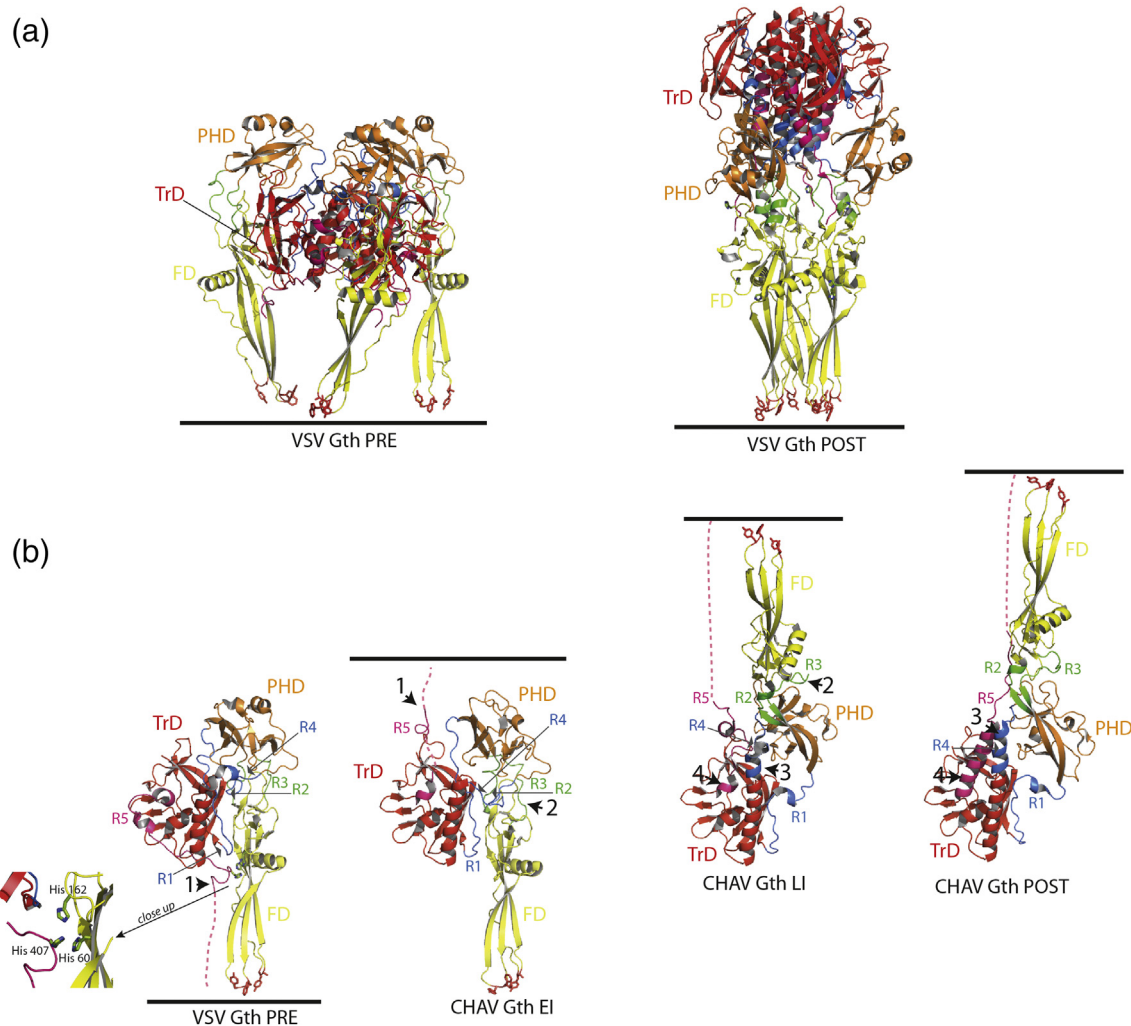


Fig. 1. Structure of vesiculovirus glycoprotein G. (a) Overall structures of the trimeric pre- and post-fusion forms of VSV glycoprotein. Left part: Ribbon diagram of VSV G_{th} pre-fusion trimer (PDB code: 5I2S). Right part: Ribbon diagram of VSV G_{th} post-fusion trimer (PDB code: 5I2M). (b) From left to right: Overall structures of VSV G_{th} pre-fusion protomer, CHAV G_{th} EI (PDB code: 5MDM), CHAV G_{th} LI (PDB code: 5MDM) and CHAV G_{th} post-fusion protomer (PDB code: 4D6W). The major difference between the pre-fusion protomer and the EI is the movement of R5 (arrowhead 1). Then, the refolding of the hinge regions R2 and R3 between PHD and FD (arrowhead 2) together with the partial elongation of the central helix implying R4 allows for the transition to the LI state. At this stage, G is already in a hairpin conformation. The formation of the last amino-terminal turn of the central helix (arrowhead 3) and the refolding of R5 into the lateral helix (arrowhead 4) concomitantly with the final trimerization form the six-helix bundle organization and achieve the structural transition. All the structures are aligned on their TrD. The histidines of the cluster H60, H162 and H407 in the pre-fusion protomer are depicted in green sticks. A close-up view of the cluster is also represented. Color code: TrD is in red, PHD is in orange, FD is in yellow, segments R1 and R4 (indicated by thin gray arrows) are in blue, segments R2 and R3 are in green, and segment R5 and C-terminal segment (cter) are in pink. The residues in the fusion loops at the tip of the FD are in red sticks. The C-terminal segments which are linked to the transmembrane domain are depicted in dashed lines. The position of the membrane relative to the protein is indicated by a black line.

[37]. At intermediate pH (pH 6.7), the shape of the spikes was not homogeneous and several forms of G could be observed [37]. In some regions, G seemed to have kept its high pH organization. Some spikes also had the typical post-fusion shape. Some elongated monomeric rod-like shape structures could be distinguished. The sequential appearance of the

different species when lowering the pH suggested that the monomers were intermediates during the conformational change [37]. Indeed, independent refolding of monomers before re-association to form the post-fusion trimer overcomes some topological problems encountered if G remains trimeric all along the structural transition [39].

Structure of monomeric intermediates

For rhabdoviral glycoproteins, the existence of an equilibrium between their different conformations suggested that it could be possible to find appropriate conditions to trap intermediates and eventually crystallize them.

We were able to obtain several crystalline forms of CHAV G_{th} . The first one corresponded to the post-fusion conformation [14]. The comparison of this structure with that of VSV- G_{th} post-fusion conformation revealed that the PHD is the most divergent domain, with the largest differences confined to the secondary structure of the major antigenic site of rhabdoviruses glycoproteins. Local differences also indicated that CHAV has evolved alternative structural solutions in hinge regions between PHD and FD as well as distinct pH-sensitive switches [14].

More interestingly, the asymmetric unit of the second crystalline form contains four CHAV G_{th} molecules exhibiting two conformations distinct from those of VSV G_{th} pre-fusion and CHAV/VSV G_{th} post-fusion conformations [31] (Figs. 1b and 2). Those crystals were grown at pH 7.5, a pH at which VSV G_{th} was shown to assume a range of intermediate monomeric conformations in solution [37].

The first protomer conformation found in the crystal asymmetric unit corresponded to an early intermediate (CHAV G_{th} EI) on the transition pathway (Fig. 1b). This protomer looks like the protomer of VSV G pre-fusion state with a single, functionally major difference: the R5 segment has already left the hydrophobic groove it occupies in VSV G pre-fusion conformation [25,31].

The second protomer conformation corresponded to a late intermediate (CHAV G_{th} LI) on the transition pathway [24,31]. It is already in an elongated hairpin conformation. However, it is not superimposable with the protomer of CHAV G_{th} post-fusion state (Fig. 1b) due to incomplete refolding of R1, R4 and R5 [24,31].

Those two structures offer a plausible pathway for the conformational change (Fig. 1b) with three major features. The first is that R5 can leave the TrD groove it occupies in the pre-fusion conformation before any other structural change. This movement is likely triggered by protonation of a cluster of histidines (H60, H162, and H407) (Fig. 1b), destabilizing the FD-R5 interaction in the pre-fusion state of the protomer [25]. The second feature is that the central helix elongates in two stages; in the LI, the helix is longer than in the pre-fusion protomer but shorter than in the post-fusion one. The third feature

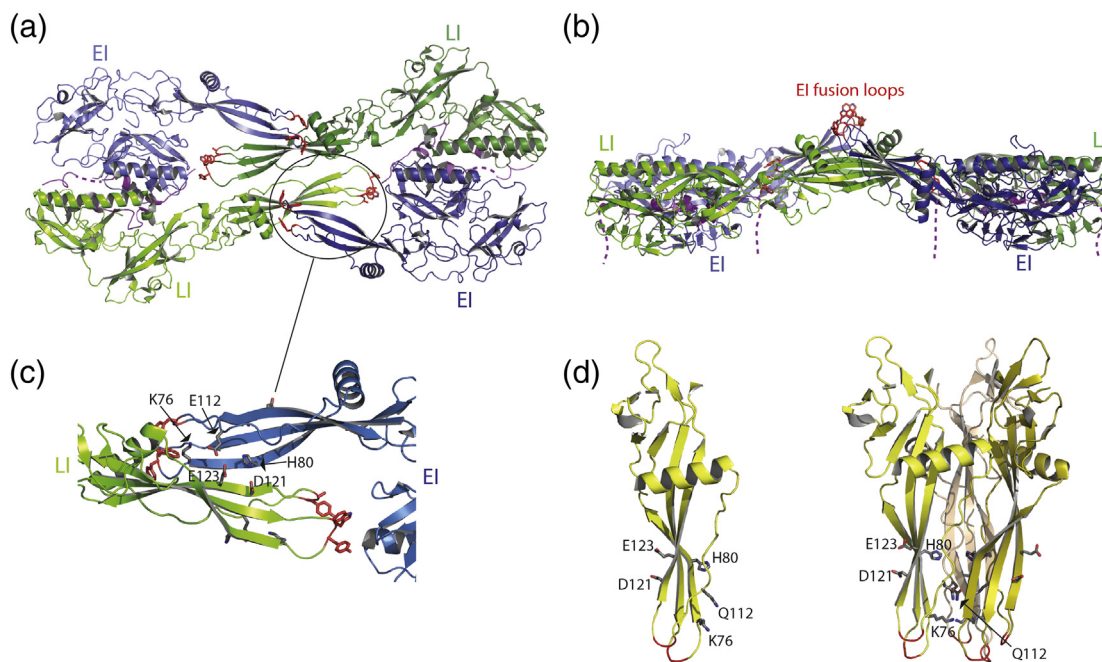


Fig. 2. Non-trimeric association of monomeric intermediate states of G . (a and b) Two views of the tetrameric assembly in the CHAV G_{th} crystal (PDB code: 5MDM) rotated by 90° . Protomers in the EI conformation are in blue. Protomers in the LI conformation are in green. The residues in the fusion loops at the tip of the FD are in red sticks. In panel B, the C-terminal segments which are linked to the transmembrane domain are depicted in dashed lines. (c) Close-up view of the antiparallel β -sheet formed between EI (in blue) and LI (in green) FDs in the crystal asymmetric unit. Key residues which cluster at the interface are represented in gray sticks. The residues in the fusion loops at the tip of the FD are in red sticks. (d) Localization of residues K76, H80, Q112, D121, E123 in the FD in the pre-fusion protomer (left part) and trimeric post-fusion (right part) conformations of VSV G .

is that most of the structural transition occurs in a monomeric form and goes to an elongated hairpin-like conformation before trimerization. Therefore, in the case of rhabdovirus G, there is no need to postulate the existence of a trimeric pre-hairpin conformation resembling those proposed for class I and class II viral fusion glycoproteins.

An antiparallel interaction between FDs required for fusion

The orientational mobility of the CHAV G_{th} EI conformation, conferred by the release of the R5 segment from the groove it occupies in the pre-fusion conformation, allows EI to orientate its fusion loops toward the target membrane.

However, in the crystal asymmetric unit, CHAV G_{th} molecules assemble in a compact dimer of EI-LI heterodimers [31] (Fig. 2a and b). The tetramer thus formed is a flat structure, from which protrude the fusion loops of the two EI, with a thickness of about 50 Å (Fig. 2b). The EI/LI dimers are stabilized by extensive contacts between hydrophobic residues of the central helix (Fig. 2a), and by positioning the R5 segment of one molecule in the hydrophobic groove of the TrD of the other. In turn, the EI/LI dimers assemble by associating their four FDs in an antiparallel arrangement (Fig. 2a and c) in which the two EI fusion loops are projected outside the tetramer (Fig. 2b). This arrangement is stabilized by the formation of an intermolecular β -sheet between two EI and LI FDs, involving residues 75 to 80 in the EI strand (located downstream of the first G fusion loop) and 120 to 125 in the LI strand (located downstream of the second fusion loop) (Fig. 2c).

In this region, two residues (D121, E123) were previously reported as sites of mutations affecting the fusion properties of both VSV [40,41] and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, a fish rhabdovirus) [42], and a mutation in position 76 was shown to compensate for a deleterious mutation in the fusion loops [43]. The crystal structures of the pre- and post-fusion conformations did not provide a molecular explanation of those phenotypes (Fig. 2d). However, the fact that in the intermolecular β -sheet found in the new crystal form, residues in positions 121 and 123 on the LI side are facing the conserved H80 on the EI side, provides an explanation (Fig. 2c).

Indeed, it was shown further in VSV G that the H80A mutation, and the E123L and D121L double mutation, which both abolish VSV G fusion properties, were rescued by the same compensatory Q112P mutation. In a single FD, residue 112 is located on the opposite side of the three-stranded β -sheet and is far from residues 121 and 123 (Fig. 2d). However, in the CHAV G_{th} crystal structure, H80, E112, D121 and E123 are clustered on the same side of the intermolecular β -sheet [31] (Fig. 2c). This strongly suggests that the

antiparallel association of the FDs observed in the crystal of CHAV G_{th} is functionally relevant and crucial for fusion.

The antiparallel character of such an assembly implies that at this stage, the FDs are positioned parallel to the viral membrane (unlike their orthogonal orientation in pre- and post-fusion trimers).

Toward a model for vesiculovirus membrane fusion

Using an *in vitro* system to characterize fusion between VSV virions and liposomes, it has been demonstrated that the glycoproteins play two distinct roles (Fig. 3). First, in the contact zone with the target membrane, they drive the formation of the initial fusion pore (Fig. 3b and c). The flat base of the bullet-shaped virions is the favored site for this process [38]. We suggest that flat assemblies involving antiparallel interactions between the FD β -sheet, similar to those described in the previous paragraph, are involved at this stage. Such an assembly, by exposing the fusion loops, is ideally suited to constitute the first bridge between the target membrane and the flat base of the viral particle (Fig. 3b). Several features should favor the formation of such intermediates specifically at the flat base of the virus, including the difference in membrane curvature (which is zero at the viral base), the lower density of viral glycoproteins [38] and maybe also distinct interactions with intraviral matrix proteins which may control G oligomeric status. Whether several such dimer-based assemblies cooperate to initiate the fusion process remains an open question. In addition, the fate of those oligomers at later stages of the fusion process is unknown.

The second stage is pore enlargement (Fig. 3d), which is the most energetically expensive step [44]. It has been shown that the spikes located outside the contact zone play a decisive role in this ultimate step by forming a helical network of post-fusion trimers [38]. Here, the structural transition toward the post-fusion trimer proceeds through monomeric EI and LI conformations (Fig. 3).

It is worth noting that, using native mass spectrometry, dimeric assemblies of both VSV G and CHAV G have been detected at pH 7.5 [31]. At such a pH, post-fusion trimers are not yet formed. Together with the progressive pH decrease after virion endocytosis, this might allow a temporal regulation of the formation of the different oligomeric species.

Differences and similarities with other viral fusion glycoproteins

We are aware that our structural data challenge the current model proposed for both class I and

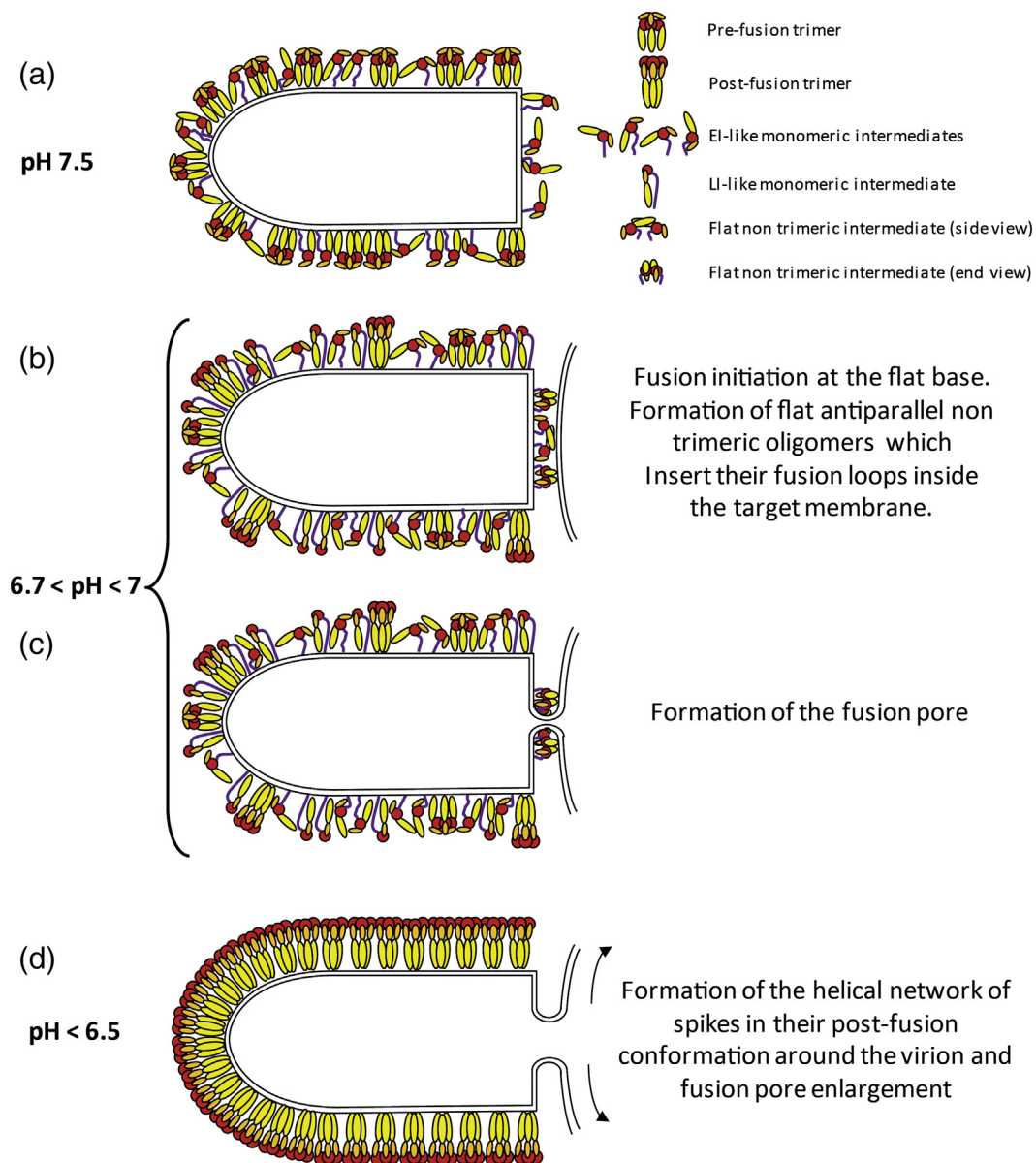


Fig. 3. A model for VSV membrane fusion. (a) At pH 7.5 in the absence of a target membrane, at the viral surface, there is an equilibrium between G pre-fusion trimer and flexible monomers [37,38] mostly in an EI-like conformation having different orientations, thanks to the flexibility of the R5 segment [31]. (b) Lowering the pH below 7 progressively shifts the equilibrium toward more elongated monomers in an LI-like conformation [31,37]. Some post-fusion trimers are already present on the lateral side of the virus. The flat base is a favorable site for the association of monomeric intermediates into flat antiparallel dimers, which insert their fusion loops in the target membrane. (c) Formation of the fusion pore. The number of oligomers involved at this stage and their exact organization around the fusion pore is not known. For convenience, on the scheme, the fusion pore has been placed at the center of the flat base. However, note that the membrane is strongly constrained at the edge of the base, a feature that might favor pore formation at this location. (d) The formation of the helical network of spikes in their post-fusion conformation on the lateral side of the virion drives the enlargement of the initial fusion pore leading to complete membrane merger. What happens to the dimers that were involved in the initiation of the fusion process is unknown. The simplest explanation is that the dimeric association is only transient and that the dimer dissociates upon protomers refolding to LI and final retrimmerization.

class II fusion glycoproteins [16], and sometimes for class III glycoproteins [26,27]. The current model postulates the formation of the so-called trimeric elongated pre-hairpin conformation that bridges the

viral and target membranes. For class I [45–48] and class II [49–51], several experimental data are consistent with this model. However, the pathway of the structural transition that we propose for vesiculovirus

G does not go through such a trimeric elongated pre-hairpin conformation, which has never been observed at the viral surface.

The question, which then arises, is whether the working of the vesiculovirus machinery is different from that of other viruses. This is all the more pertinent because (i) all the experimental data suggest that the membrane fusion pathway (i.e., the lipidic intermediates which are formed) is very similar for all the enveloped viruses studied so far regardless of the organization of their fusion machinery [52–54], and (ii) fusion kinetics of individual virions for influenza virus (class I), West Nile virus (class II), and VSV could all be fit to models based on very similar sequence of conformational events [13,55,56]. Therefore, in this last part, we will discuss data obtained on other viral fusion glycoproteins from both class I and class II and focus on some features reminiscent of what is observed for vesiculovirus G.

First, class II fusion proteins are known to transition from a (homo- or hetero-) pre-fusion dimer to a post-fusion trimer [57–62] through a monomeric intermediate [63,64], and a crystalline structure of a monomer of Rift Valley fever virus (a phlebovirus, member of the bunyaviridae family) Gc in an extended conformation, which may represent a transition intermediate, has been determined [65]. Indeed, several experiments have indicated that class II fusion glycoproteins are monomeric when they interact with the target membrane [66]. Cryo-electron tomography (cryo-ET) analysis revealed bridge-like densities between acidified virions and liposomes with dimensions consistent with those of extended monomers for Rift Valley fever virus [67], Uukuniemi virus (another phlebovirus) [68] and Sindbis virus (an alphavirus) [69]. In the latter case, the orientation of the fusion glycoprotein (E1) relative to the virus surface appeared to be variable. The bridge-like densities between the virus and target membrane were either normal or at a slant relative to the virus surface. As suggested by the authors, this flexibility might allow E1 to bind the target membrane at different distances and curvatures [69]. The stage of the refolding process at which trimerization occurs still remains a matter of debate. Indeed, different conclusions have been drawn depending on the virus and the experiments. Biochemical data have suggested that, for Semliki Forest virus (an alphavirus) and Dengue virus (a flavivirus), trimer formation is relatively rapid and precedes the folding back of the carboxy-terminal domain [49–51]. On the other hand, for tick-borne encephalitis virus (a flavivirus), it has been suggested that trimerization may occur at a late stage of the refolding process [66].

Second, in the case of class I fusion glycoproteins, which are trimeric in both their pre- and post-fusion states [16], it is well known that their ectodomains are often monomeric when expressed in the absence

of the transmembrane domain. To obtain a stable trimeric pre-fusion structure, the C-terminal part of the ectodomain is fused to a trimerization motif, based either on the transcription factor GCN4, as in the case of coronavirus S [70], parainfluenza virus 5 F glycoproteins [71] and Hendra virus F glycoprotein [72], or the T4 fibrin motif, as in the case of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein [73]. Even for influenza HA, the dogma of the stability of the trimeric state all along the structural transition could be called into question in view of the growing number of crystalline structures that do not display any threefold symmetry (PDB entry codes: 4EDA, 5A3I 5K9K, 5K9O and 5IBL) [74–77] (Fig. 4). More remarkably, in those crystal structures, the monomer structure is quite different from the structure of HA protomer in the trimeric pre-fusion state (Fig. 4b). Particularly, the helix A is longer as part of the loop has initiated its transition toward a helical conformation (Fig. 4b). On the other hand, the helix B is shorter (Fig. 4b). The fact that several crystalline structures of distinct HA subtypes contain a monomeric conformation suggests that it cannot be only a crystallization artifact and that those monomers might be transient intermediates that are trapped during the crystallization process. All those monomeric structures have been obtained in complex with a Fab, which may also have contributed to their catching in the crystal. If those structures correspond to real intermediates, they suggest a refolding pathway for HA monomer in which helix A elongation progressively displaces the loop in the structure of the helix B until this loop reaches the position it occupies in the post-fusion structure of HA2.

It is worth noting that EM images and cryo-ET have also provided several views of the membrane remodeling events and some structural snapshots of HA during the fusion process [81–84]. They are consistent with the initial formation of flexible extended intermediates which interact with the target membrane and refold into a post-fusion-like structure which is perpendicular to the axis of the fusion pore (i.e., parallel to the fusing membranes). However, the resolution of those structures is not sufficient to definitively conclude on their oligomeric state, although the authors suggest that they might be trimeric [84].

Finally, the formation of a regular network of fusion glycoproteins in their post-fusion state is not exclusive of vesiculovirus G. More or less regular networks have been also observed with other class III fusion glycoproteins such as pseudorabies gB [85] and several class II fusion glycoproteins [51,86,87]. As suggested for vesiculoviruses [38], it is possible that the glycoproteins located outside the contact zone between fusing membranes have a role, probably at a late stage of the fusion process (i.e., enlargement of the fusion pore) via the formation of more or less regular arrays.

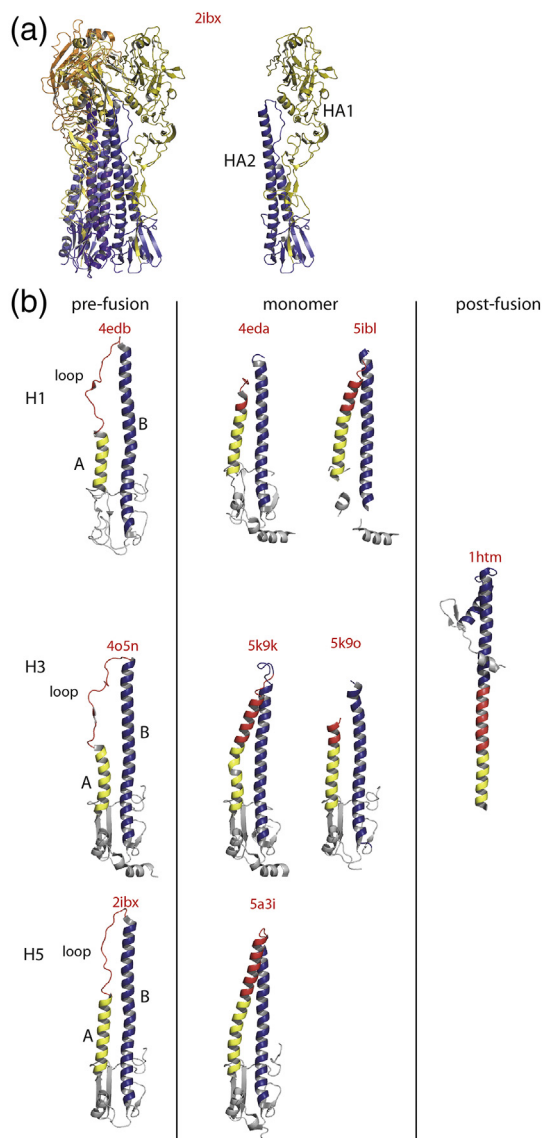


Fig. 4. Monomeric HA structures. (a) Structure of HA pre-fusion state (H5 subtype, PDB code 2IBX [78]). Left: Ribbon diagram of HA pre-fusion trimer. The HA1 subunits are colored in a shade of yellow. The HA2 subunits are colored in a shade of blue. Right: Ribbon diagram of HA protomer. (b) First row: ribbon diagrams of HA2 structure (H1 subtype) as in the pre-fusion protomer [74] and in two monomeric HA structures [74,77]. Second row: ribbon diagrams of HA2 structure (H3 subtype) [79] as in the pre-fusion protomer, in two monomeric HA0 structures [76] and as in its trimeric post-fusion conformation [80]. Third row: ribbon diagrams of HA2 structure (H5 subtype) as in the pre-fusion protomer [78] and in a monomeric HA structures [75]. The residues are colored by their secondary structure in the pre-fusion protomer. Residues corresponding to helix A are in yellow, to helix B in blue and to the loop located between helices A and B in red. In several monomers, the part of the chain corresponding to the loop between helices A and B is not visible in the crystal. All the structures are aligned on helix A of the pre-fusion protomer. The corresponding PDB codes are indicated above each structure.

Final remarks and conclusion

The determination of an increasing number of structures of viral fusion and the associated functional studies have shed light on the working of the fusion machinery. Globally, this has revealed similar principles of action even if the proteins involved have very different structural organizations. However, the nature of intermediates and how they cooperate inside and potentially outside the target membrane contact zone remain largely elusive.

Novel structures of such intermediates are required to complete our understanding of the transition pathway for each class of viral fusion glycoproteins. Cryo-EM and cryo-ET enhanced by direct electron detection devices, improved microscopes with more stable optics, and advances in image processing software [88–91] should make it possible to visualize the conformation of the glycoproteins while they interact with a target membrane. Indeed, as mentioned above, some progresses have already been made for both class I [81–84,92] and class II fusion glycoproteins [67–69]; however, a higher resolution will be required to get a reliable quasi-atomic model of those intermediates.

Acknowledgments

We thank Nathan Jespersen for providing language help and careful reading of the manuscript. This work was supported by a grant from ANR (ANR CE11 MOBARHE) to Y.G.

Received 31 January 2018;

Received in revised form 6 April 2018;

Accepted 10 April 2018

Available online 18 April 2018

Keywords:

Vesiculovirus;
Influenza;
glycoprotein;
membrane fusion;
conformational change

Abbreviations used:

VSV, vesicular stomatitis virus; CHAV, Chandipura virus; G, glycoprotein; HA, hemagglutinin; EM, electron microscopy; FD, fusion domain; PHD, pleckstrin homology domain; TrD, trimerization domain; PDB, Protein Data Bank; cryo-ET, cryo-electron tomography.

References

- [1] G.N. Barber, Vsv-tumor selective replication and protein translation, *Oncogene* 24 (2005) 7710–7719.

- [2] M. Fernandez, M. Porosnicu, D. Markovic, G.N. Barber, Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease, *J. Virol.* 76 (2002) 895–904.
- [3] E. Hastie, V.Z. Grdzlishvili, Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer, *J. Gen. Virol.* 93 (2012) 2529–2545.
- [4] S. Menghani, R. Chikhale, A. Raval, P. Wadibhasme, P. Khedekar, Chandipura virus: an emerging tropical pathogen, *Acta Trop.* 124 (2012) 1–14.
- [5] A.A.V. Albertini, E. Baquero, A. Ferlin, Y. Gaudin, Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry, *Viruses* 4 (2012) 117–139.
- [6] D. Finkelshtein, A. Werman, D. Novick, S. Barak, M. Rubinstein, Ldl receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 7306–7311.
- [7] J. Nikolic, L. Belot, H. Raux, P. Legrand, Y. Gaudin, A.A. Albertini, Structural basis for the recognition of ldl-receptor family members by vsv glycoprotein, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1029.
- [8] D.K. Cureton, R.H. Massol, S. Saffarian, T.L. Kirchhausen, S. P. Whelan, Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization, *PLoS Pathog.* 5 (2009), e1000394.
- [9] H.K. Johannsdottir, R. Mancini, J. Kartenbeck, L. Amato, A. Helenius, Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry, *J. Virol.* 83 (2009) 440–453.
- [10] S. Roche, A.A. Albertini, J. Lepault, S. Bressanelli, Y. Gaudin, Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 1716–1728.
- [11] R.W. Doms, D.S. Keller, A. Helenius, W.E. Balch, Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus g protein trimers, *J. Cell Biol.* 105 (1987) 1957–1969.
- [12] Y. Gaudin, C. Tuffereau, D. Segretain, M. Knossow, A. Flamand, Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein, *J. Virol.* 65 (1991) 4853–4859.
- [13] I.S. Kim, S. Jenni, M.L. Stanifer, E. Roth, S.P. Whelan, A.M. van Oijen, S.C. Harrison, Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus g protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E28–E36.
- [14] E. Baquero, A.A. Albertini, H. Raux, L. Buonocore, J.K. Rose, S. Bressanelli, Y. Gaudin, Structure of the low pH conformation of chandipura virus g reveals important features in the evolution of the vesiculovirus glycoprotein, *PLoS Pathog.* 11 (2015), e1004756.
- [15] S. Roche, Y. Gaudin, Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers, *Virology* 297 (2002) 128–135.
- [16] S.C. Harrison, Viral membrane fusion, *Virology* 479–480 (2015) 498–507.
- [17] J. Kadlec, S. Loureiro, N.G. Abrescia, D.I. Stuart, I.M. Jones, The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (2008) 1024–1030.
- [18] M. Backovic, R. Longnecker, T.S. Jardetzky, Structure of a trimeric variant of the Epstein–Barr virus glycoprotein b, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 2880–2885.
- [19] H.G. Burke, E.E. Heldwein, Crystal structure of the human cytomegalovirus glycoprotein b, *PLoS Pathog.* 11 (2015), e1005227.
- [20] S. Chandramouli, C. Ciferri, P.A. Nikitin, S. Calo, R. Gerrein, K. Balabanis, J. Monroe, C. Hebner, A.E. Lilja, E.C. Settembre, et al., Structure of hcmv glycoprotein b in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8176.
- [21] E.E. Heldwein, H. Lou, F.C. Bender, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, S.C. Harrison, Crystal structure of glycoprotein b from herpes simplex virus 1, *Science* 313 (2006) 217–220.
- [22] R. Peng, S. Zhang, Y. Cui, Y. Shi, G.F. Gao, J. Qi, Structures of human-infecting thogotovirus fusogens support a common ancestor with insect baculovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E8905–E8912.
- [23] E. Baquero, A.A. Albertini, Y. Gaudin, Recent mechanistic and structural insights on class III viral fusion glycoproteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 33 (2015) 52–60.
- [24] S. Roche, S. Bressanelli, F.A. Rey, Y. Gaudin, Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein g, *Science* 313 (2006) 187–191.
- [25] S. Roche, F.A. Rey, Y. Gaudin, S. Bressanelli, Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein g, *Science* 315 (2007) 843–848.
- [26] J. Fontana, D. Atanasiu, W.T. Saw, J.R. Gallagher, R.G. Cox, J. C. Whitbeck, L.M. Brown, R.J. Eisenberg, G.H. Cohen, The fusion loops of the initial prefusion conformation of herpes simplex virus 1 fusion protein point toward the membrane, *MBio* 8 (2017).
- [27] T. Zeev-Ben-Mordehai, D. Vasishtan, A. Hernandez Duran, B. Vollmer, P. White, A. Prasad Pandurangan, C.A. Siebert, M. Topf, K. Grunewald, Two distinct trimeric conformations of natively membrane-anchored full-length herpes simplex virus 1 glycoprotein b, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 4176–4181.
- [28] J.R. Gallagher, D. Atanasiu, W.T. Saw, M.J. Paradisgarten, J.C. Whitbeck, R.J. Eisenberg, G.H. Cohen, Functional fluorescent protein insertions in herpes simplex virus gb report on gb conformation before and after execution of membrane fusion, *PLoS Pathog.* 10 (2014), e1004373.
- [29] W. Weissenhorn, A. Carfi, K.H. Lee, J.J. Skehel, D.C. Wiley, Crystal structure of the ebola virus membrane fusion subunit, gp2, from the envelope glycoprotein ectodomain, *Mol. Cell* 2 (1998) 605–616.
- [30] W. Weissenhorn, A. Dessen, S.C. Harrison, J.J. Skehel, D.C. Wiley, Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41, *Nature* 387 (1997) 426–430.
- [31] E. Baquero, A.A. Albertini, H. Raux, A. Abou-Hamdan, E. Boeri-Erba, M. Ouldali, L. Buonocore, J.K. Rose, J. Lepault, S. Bressanelli, et al., Structural intermediates in the fusion-associated transition of vesiculovirus glycoprotein, *EMBO J.* 36 (2017) 679–692.
- [32] D.L. Crimmins, W.B. Mehard, S. Schlesinger, Physical properties of a soluble form of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus at neutral and acidic pH, *Biochemistry* 22 (1983) 5790–5796.
- [33] D.S. Lyles, V.A. Varela, J.W. Parce, Dynamic nature of the quaternary structure of the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein, *Biochemistry* 29 (1990) 2442–2449.
- [34] P. Zagouras, J.K. Rose, Dynamic equilibrium between vesicular stomatitis virus glycoprotein monomers and trimers in the Golgi and at the cell surface, *J. Virol.* 67 (1993) 7533–7538.
- [35] P. Zagouras, A. Ruusala, J.K. Rose, Dissociation and reassociation of oligomeric viral glycoprotein subunits in the endoplasmic reticulum, *J. Virol.* 65 (1991) 1976–1984.
- [36] I.A. Wilson, J.J. Skehel, D.C. Wiley, Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution, *Nature* 289 (1981) 366–373.

- [37] A.A. Albertini, C. Merigoux, S. Libersou, K. Madiona, S. Bressanelli, S. Roche, J. Lepault, R. Melki, P. Vachette, Y. Gaudin, Characterization of monomeric intermediates during vsv glycoprotein structural transition, *PLoS Pathog.* 8 (2012), e1002556.
- [38] S. Libersou, A.A. Albertini, M. Ouldali, V. Maury, C. Maheu, H. Raux, F. de Haas, S. Roche, Y. Gaudin, J. Lepault, Distinct structural rearrangements of the vsv glycoprotein drive membrane fusion, *J. Cell Biol.* 191 (2010) 199–210.
- [39] E. Baquero, A.A. Albertini, P. Vachette, J. Lepault, S. Bressanelli, Y. Gaudin, Intermediate conformations during viral fusion glycoprotein structural transition, *Curr. Opin. Virol.* 3 (2013) 143–150.
- [40] B.L. Fredericksen, M.A. Whitt, Mutations at two conserved acidic amino acids in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect pH-dependent conformational changes and reduce the pH threshold for membrane fusion, *Virology* 217 (1996) 49–57.
- [41] L. Zhang, H.P. Ghosh, Characterization of the putative fusogenic domain in vesicular stomatitis virus glycoprotein g, *J. Virol.* 68 (1994) 2186–2193.
- [42] Y. Gaudin, P. de Kinkelin, A. Benmansour, Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion, *J. Gen. Virol.* 80 (1999) 1221–1229.
- [43] M.L. Stanifer, D.K. Cureton, S.P. Whelan, A recombinant vesicular stomatitis virus bearing a lethal mutation in the glycoprotein gene uncovers a second site suppressor that restores fusion, *J. Virol.* 85 (2011) 8105–8115.
- [44] F.S. Cohen, G.B. Melikyan, The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement, *J. Membr. Biol.* 199 (2004) 1–14.
- [45] R.A. Furuta, C.T. Wild, Y. Weng, C.D. Weiss, Capture of an early fusion-active conformation of hiv-1 gp41, *Nat. Struct. Biol.* 5 (1998) 276–279.
- [46] Y.H. Kim, J.E. Donald, G. Grigoryan, G.P. Leser, A.Y. Fadeev, R.A. Lamb, W.F. DeGrado, Capture and imaging of a prehairpin fusion intermediate of the paramyxovirus piv5, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 20992–20997.
- [47] C.J. Russell, T.S. Jardetzky, R.A. Lamb, Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion, *EMBO J.* 20 (2001) 4024–4034.
- [48] C.T. Wild, D.C. Shugars, T.K. Greenwell, C.B. McDanal, T.J. Matthews, Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 9770–9774.
- [49] M. Liao, M. Kielian, Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 111–120.
- [50] G. Roman-Sosa, M. Kielian, The interaction of alphavirus e1 protein with exogenous domain III defines stages in virus-membrane fusion, *J. Virol.* 85 (2011) 12271–12279.
- [51] C. Sanchez-San Martin, H. Sosa, M. Kielian, A stable prefusion intermediate of the alphavirus fusion protein reveals critical features of class II membrane fusion, *Cell Host Microbe* 4 (2008) 600–608.
- [52] L.V. Chernomordik, V.A. Frolov, E. Leikina, P. Bronk, J. Zimmerberg, The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 1369–1382.
- [53] Y. Gaudin, Rabies virus-induced membrane fusion pathway, *J. Cell Biol.* 150 (2000) 601–612.
- [54] E. Zaitseva, A. Mittal, D.E. Griffin, L.V. Chernomordik, Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins, *J. Cell Biol.* 169 (2005) 167–177.
- [55] L.H. Chao, D.E. Klein, A.G. Schmidt, J.M. Pena, S.C. Harrison, Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion, *elife* 3 (2014), e04389.
- [56] T. Ivanovic, J.L. Choi, S.P. Whelan, A.M. van Oijen, S.C. Harrison, Influenza-virus membrane fusion by cooperative fold-back of stochastically induced hemagglutinin intermediates, *elife* 2 (2013), e00333.
- [57] S. Bressanelli, K. Stiasny, S.L. Allison, E.A. Stura, S. Duquerroy, J. Lescar, F.X. Heinz, F.A. Rey, Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation, *EMBO J.* 23 (2004) 728–738.
- [58] D.L. Gibbons, M.C. Vaney, A. Roussel, A. Vigouroux, B. Reilly, J. Lepault, M. Kielian, F.A. Rey, Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of semliki forest virus, *Nature* 427 (2004) 320–325.
- [59] J. Lescar, A. Roussel, M.W. Wien, J. Navaza, S.D. Fuller, G. Wengler, G. Wengler, F.A. Rey, The fusion glycoprotein shell of semliki forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH, *Cell* 105 (2001) 137–148.
- [60] Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, S.C. Harrison, A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 6986–6991.
- [61] Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, S.C. Harrison, Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion, *Nature* 427 (2004) 313–319.
- [62] F.A. Rey, F.X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, S.C. Harrison, The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution, *Nature* 375 (1995) 291–298.
- [63] K. Stiasny, S.L. Allison, A. Marchler-Bauer, C. Kunz, F.X. Heinz, Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus, *J. Virol.* 70 (1996) 8142–8147.
- [64] J.M. Wahlberg, H. Garoff, Membrane fusion process of semliki forest virus. I: low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells, *J. Cell Biol.* 116 (1992) 339–348.
- [65] M. Dessau, Y. Modis, Crystal structure of glycoprotein c from rift valley fever virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 1696–1701.
- [66] K. Stiasny, C. Kossel, J. Lepault, F.A. Rey, F.X. Heinz, Characterization of a structural intermediate of flavivirus membrane fusion, *PLoS Pathog.* 3 (2007), e20.
- [67] S. Halldorsson, S. Li, M. Li, K. Harlos, T.A. Bowden, J.T. Huiskonen, Shielding and activation of a viral membrane fusion protein, *Nat. Commun.* 9 (2018) 349.
- [68] D. Bitto, S. Halldorsson, A. Caputo, J.T. Huiskonen, Low pH and anionic lipid-dependent fusion of uukuniemi pHlebovirus to liposomes, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 6412–6422.
- [69] S. Cao, W. Zhang, Characterization of an early-stage fusion intermediate of sindbis virus using cryoelectron microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 13362–13367.
- [70] A. Walls, M.A. Tortorici, B.J. Bosch, B. Frenz, P.J. Rotlier, F. DiMaio, F.A. Rey, D. Veasler, Crucial steps in the structure determination of a coronavirus spike glycoprotein using cryo-electron microscopy, *Protein Sci.* 26 (2017) 113–121.
- [71] H.S. Yin, X. Wen, R.G. Paterson, R.A. Lamb, T.S. Jardetzky, Structure of the parainfluenza virus 5 f protein in its metastable, prefusion conformation, *Nature* 439 (2006) 38–44.

- [72] J.J. Wong, R.G. Paterson, R.A. Lamb, T.S. Jardetzky, Structure and stabilization of the hendra virus glycoprotein in its prefusion form, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 1056–1061.
- [73] J.S. McLellan, M. Chen, S. Leung, K.W. Graepel, X. Du, Y. Yang, T. Zhou, U. Baxa, E. Yasuda, T. Beaumont, et al., Structure of rsv fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody, *Science* 340 (2013) 1113–1117.
- [74] K.J. Cho, J.H. Lee, K.W. Hong, S.H. Kim, Y. Park, J.Y. Lee, S. Kang, S. Kim, J.H. Yang, E.K. Kim, et al., Insight into structural diversity of influenza virus haemagglutinin, *J. Gen. Virol.* 94 (2013) 1712–1722.
- [75] X. Xiong, D. Corti, J. Liu, D. Pinna, M. Foglierini, L.J. Calder, S. R. Martin, Y.P. Lin, P.A. Walker, P.J. Collins, et al., Structures of complexes formed by h5 influenza hemagglutinin with a potent broadly neutralizing human monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 9430–9435.
- [76] M.G. Joyce, A.K. Wheatley, P.V. Thomas, G.Y. Chuang, C. Soto, R.T. Bailer, A. Druz, I.S. Georgiev, R.A. Gillespie, M. Kanekiyo, et al., Vaccine-induced antibodies that neutralize group 1 and group 2 influenza A viruses, *Cell* 166 (2016) 609–623.
- [77] D.D. Raymond, S.M. Stewart, J. Lee, J. Ferdman, G. Bajic, K. T. Do, M.J. Erandes, P. Suphaphiphat, E.C. Settembre, P. R. Dormitzer, et al., Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain, *Nat. Med.* 22 (2016) 1465–1469.
- [78] S. Yamada, Y. Suzuki, T. Suzuki, M.Q. Le, C.A. Nidom, Y. Sakai-Tagawa, Y. Muramoto, M. Ito, M. Kiso, T. Horimoto, et al., Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors, *Nature* 444 (2006) 378–382.
- [79] P.S. Lee, N. Ohshima, R.L. Stanfield, W. Yu, Y. Iba, Y. Okuno, Y. Kurosawa, I.A. Wilson, Receptor mimicry by antibody F045-092 facilitates universal binding to the H3 subtype of influenza virus, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3614.
- [80] P.A. Bullough, F.M. Hughson, J.J. Skehel, D.C. Wiley, Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion, *Nature* 371 (1994) 37–43.
- [81] K.K. Lee, Architecture of a nascent viral fusion pore, *EMBO J.* 29 (2010) 1299–1311.
- [82] P. Chlanda, E. Mekhedov, H. Waters, C.L. Schwartz, E.R. Fischer, R.J. Ryham, F.S. Cohen, P.S. Blank, J. Zimmerberg, The hemifusion structure induced by influenza virus haemagglutinin is determined by physical properties of the target membranes, *Nat. Microbiol.* 1 (2016), 16050.
- [83] L. Gui, J.L. Ebner, A. Mileant, J.A. Williams, K.K. Lee, Visualization and sequencing of membrane remodeling leading to influenza virus fusion, *J. Virol.* 90 (2016) 6948–6962.
- [84] L.J. Calder, P.B. Rosenthal, Cryomicroscopy provides structural snapshots of influenza virus membrane fusion, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (2016) 853–858.
- [85] M. Vallbracht, D. Brun, M. Tassinari, M.C. Vaney, G. Pehau-Arnaudet, P. Guardado-Calvo, A. Haouz, B.G. Klupp, T.C. Mettenleiter, F.A. Rey, et al., Structure-function dissection of the pseudorabies virus glycoprotein b fusion loops, *J. Virol.* 92 (2018) e01203–e01217.
- [86] D.L. Gibbons, I. Erk, B. Reilly, J. Navaza, M. Kielian, F.A. Rey, J. Lepault, Visualization of the target-membrane-inserted fusion protein of semliki forest virus by combined electron microscopy and crystallography, *Cell* 114 (2003) 573–583.
- [87] K. Stiasny, S. Bressanelli, J. Lepault, F.A. Rey, F.X. Heinz, Characterization of a membrane-associated trimeric low-pH-induced form of the class II viral fusion protein e from tick-borne encephalitis virus and its crystallization, *J. Virol.* 78 (2004) 3178–3183.
- [88] L.A. Baker, M. Grange, K. Grunewald, Electron cryotomography captures macromolecular complexes in native environments, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 46 (2017) 149–156.
- [89] C.K. Cassidy, B.A. Himes, Z. Luthey-Schulten, P. Zhang, Cryoem-based hybrid modeling approaches for structure determination, *Curr. Opin. Microbiol.* 43 (2017) 14–23.
- [90] D. Elmlund, S.N. Le, H. Elmlund, High-resolution cryo-em: the nuts and bolts, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 46 (2017) 1–6.
- [91] K.R. Vinothkumar, R. Henderson, Single particle electron cryomicroscopy: trends, issues and future perspective, *Q. Rev. Biophys.* 49 (2016), e13.
- [92] G. Cardone, M. Brecher, J. Fontana, D.C. Winkler, C. Butan, J.M. White, A.C. Steven, Visualization of the two-step fusion process of the retrovirus avian sarcoma/leukosis virus by cryo-electron tomography, *J. Virol.* 86 (2012) 12129–12137.

Abstract

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

Mokola virus (MOKV) belongs to the lyssavirus genus. As other genus members (including rabies virus - RABV -), it causes deadly encephalitis in mammals. MOKV entry into host cells is mediated by its transmembrane glycoprotein G. First, G binds cellular receptors, triggering virion endocytosis. Then, in the acidic endosomal environment, G undergoes a conformational change, from its pre- toward its post-fusion state, that catalyzes merger of the viral and endosomal membranes. Here, we have determined the crystal structure of a soluble MOKV G ectodomain in which the hydrophobic fusion loops have been replaced by more hydrophilic sequences. The crystal structure correspond to a monomer that is similar to the protomer of the trimeric post-fusion state of vesicular stomatitis virus (VSV) G. However, by electron microscopy, we show that, at low pH, at the surface of pseudotyped VSV, MOKV spikes adopts the trimeric post-fusion conformation and have a tendency to reorganize into regular arrays. Sequence alignment between MOKV G and RABV G allows a precise location of RABV G antigenic sites. Repositioning MOKV G domains on VSV G pre-fusion structure reveals that antigenic sites are located in the most exposed part of the molecule in its pre-fusion conformation and are therefore very accessible to antibodies. Finally, the structure allows the identification of pH sensitive molecular switches. Particularly, the long helix, which constitutes the core of the post-fusion trimer for class III fusion glycoproteins, contains many acidic residues located at the trimeric interface. Several of them, aligned along the helix, point toward the trimer axis. They have to be protonated for the post-fusion trimer to be stable. At high pH, when they are negatively charged, they destabilize the interface, which explains the conformational change reversibility. Globally, this first lyssavirus G structure paves the way for the development of a pan-lyssavirus vaccine.

49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68

Author summary

Mokola virus (MOKV), as other lyssaviruses including rabies virus (RABV), causes deadly encephalitis in mammals. Its envelope glycoprotein G is involved in two successive steps of virus entry: receptor recognition, to allow virion endocytosis, and fusion of viral and endosomal membranes, to release of the viral nucleocapsid into the cytoplasm for the subsequent steps of infection. Fusion is triggered by a low pH-driven conformational change of G from its pre-fusion toward its post-fusion conformation. G is also the target of neutralizing antibodies. We have determined the crystal structure of MOKV G in its post-fusion conformation. This allows the precise location of the antigenic sites of lyssaviruses glycoproteins that are exposed at the top of the molecule in a model of MOKV G pre-fusion state. We also identified several acidic residues and two histidines that play the role of pH sensitive molecular switches during the structural transition. This work paves the way for the development of a pan-lyssavirus vaccine. Furthermore, as RABV G is used for transneuronal tracing and studies of monosynaptic connections, the knowledge of MOKV G structure might be useful to improve the available tools in this field.

Introduction

69

70

71 Lyssavirus is a genus of the Rhabdoviridae family which consists of 16 species. Lyssaviruses
72 all cause acute progressive encephalitis (rabies disease) in mammals and are transmitted
73 between susceptible individuals directly by bites, scratches or contamination of mucous
74 membranes with infected saliva. They have been classified into 3 phylogroups: the prototype
75 of phylogroup I is rabies virus (RABV), the prototype of phylogroup II is Mokola virus
76 (MOKV) and the prototype of phylogroup III is West Caucasian Bat Lyssavirus (WCBV)(1).

77

78

79

80

81

82

83

84

They are enveloped viruses and their genome encodes a single transmembrane
glycoprotein (G) that constitutes the spikes that protrude at the viral surface. G plays a key role
in the initial stages of infection (2, 3). First, it binds cellular receptors(4-7). Thereafter, the viral
particle enters the cell via the endocytic pathway(8, 9). Then, the acidic environment of the
endosome induces a huge conformational change of G, from a native (or pre-fusion) state
toward a final (or post-fusion) state, that catalyzes fusion of the viral envelope with the
endosomal membrane(10). This results in the release of the nucleocapsid in the cytoplasm for
the subsequent steps of infection.

85

86

87

88

89

90

The glycoprotein G is a type I glycoprotein. After cleavage of the N-terminal signal
peptide, the mature glycoprotein is about 500 amino acid residues long (505 for RABV, 503
for MOKV). It is anchored in the membrane by a single α -helical transmembrane segment. The
bulk of the mass of G is located outside the viral membrane and constitutes the N-terminal
ectodomain that is N-glycosylated (Fig. 1A). The number of glycosylation sites may vary from
one lyssavirus to another.

91

92

93

At the surface of the virus, it has been shown that RABV G is organized in trimers(11).
At pH 7.3, the spikes are in their pre-fusion conformation and form a well-defined layer that is
8-nm-thick at the virion surface(11). At low pH (below pH 6.4), a more wavy layer of elongated

94 spikes (~11.5 nm) in their post-fusion state is observed(10). At low pH, RABV virions have
95 also a strong tendency to aggregate (10), a feature which is presumably due to transient
96 exposition of G fusion loops that are hydrophobic motifs interacting with the target membrane
97 as a first step of the fusion process(12). Remarkably, G structural transition is reversible and
98 there is an equilibrium between different states of G, which is shifted toward the post-fusion
99 conformation at low pH(10, 13).

100 G ectodomain is the target of neutralizing antibodies(14-17). Several hundred
101 monoclonal antibodies (MAbs) have been used to characterize the antigenic structure of RABV
102 G(14, 16, 18-20). It has two major antigenic sites (antigenic site II and antigenic site III)(19,
103 20). Antigenic site III (extending from residues 330 to 338) is associated with virulence(20,
104 21). Particularly, RABV antigenic mutants having amino acid substitutions at position 333 have
105 an avirulent phenotype(20-22) and presence of a lysine and an arginine respectively in positions
106 330 and 333 of RABV G is required for virus penetration into the motor and sensory neurons
107 of adult mice(22). Finally, in addition to these major antigenic sites, one minor antigenic site
108 (minor antigenic site a) (14) and a few isolated epitopes (18, 23) have been described.

109 Sequence alignments indicate that lyssaviruses glycoproteins adopt the same fold as
110 other rhabdovirus glycoproteins and therefore belong to the third class (class III) of viral fusion
111 glycoproteins. However, in the rhabdovirus family, only crystal structures of glycoproteins
112 belonging to members of the vesiculovirus genus have been determined. They include the
113 trimeric pre-fusion state of vesicular stomatitis virus (VSV) G(24), the trimeric post-fusion state
114 of VSV and Chandipura virus (CHAV) G(25, 26), and monomeric states of CHAV G
115 corresponding to early and late intermediates during the structural transition pathway(27).

116 Here, we present the crystal structure of a soluble MOKV G ectodomain, expressed in
117 *Drosophila* Schneider 2 (S2) cells. Comparison with vesiculovirus glycoprotein structures
118 reveals that the crystal contains a monomeric form of G having the organization of a protomer

119 of the post-fusion trimer. Using negative staining electron microscopy (EM), we detected post-
120 fusion trimers of soluble MOKV G ectodomain interacting with membranes as well as of full-
121 length MOKV G at the surface of VSV pseudotypes. EM also revealed that as VSV G, MOKV
122 G in its post-fusion conformation, forms regular networks. Finally, MOKV G crystal structure
123 allows the precise localization of the antigenic sites of lyssavirus glycoproteins and provides
124 the molecular basis of the reversibility of the conformational change.

125

126

Results

127

128

129 Expression, purification and characterization of MOKV G ectodomain

130 We synthesized two genes encoding MOKV G ectodomain (residues 1-436) C-
131 terminally fused to an enterokinase-cleavable double StrepTag. The first gene corresponded to
132 the wild type ectodomain sequence (G_{1-436}^{WT}). The second one corresponded to a construct in
133 which the hydrophobic fusion loops $^{74}FVGY^{77}$ and $^{121}WL^{122}$ have been replaced by more
134 hydrophilic sequences $^{74}GNGS^{77}$ and $^{121}GS^{122}$ (G_{1-436}^{**}) (Fig.1A).

135 Both constructs were expressed using stably transfected S2 cells. Production yield of
136 G_{1-436}^{**} was much higher than G_{1-436}^{WT} . Furthermore, the purity of G_{1-436}^{**} after affinity
137 chromatography was much better than that of G_{1-436}^{WT} . As a consequence, only G_{1-436}^{**} was
138 further characterized. The mass of the protein was determined by SEC-MALS (Fig. 1B). At pH
139 8, the molecular mass of 56.5 ± 0.2 kDa was constant across the elution peak and is consistent
140 with the mass of a monomer of G_{1-436}^{**} (52682 Da) having two glycosylation sites. At pH 6,
141 the protein remains stuck on the column impeding its mass determination.

142 The structure of G_{1-436}^{**} was also analyzed by negative staining EM at pH 7.5 and 5.5
143 (Fig. 1C). At pH 7.5, no defined molecular shape could be identified due to the small size and/or
144 flexibility of monomeric G_{1-436}^{**} . At pH 5.5, elongated structures were observed. However,
145 they appear thinner than VSV G_{th} (aa residues 1-422, VSV G fragment that was previously
146 crystallized(26)) *bona fide* post-fusion trimers, suggesting that they correspond to extended
147 monomers.

148

149 Crystal structure of MOKV G_{1-436}^{**}

150 We screened several crystallization conditions for MOKV G_{1-436}^{**} and obtained
151 crystals at pH 6.5 and determined the structure of the protein at 2.9 Å resolution by single-

152 wavelength anomalous dispersion (SAD) (Table 1). The asymmetric unit contained a single
153 protein. The chain was traced from residues 1 to 109 and 118 to 401 (Fig. 2A). Although the
154 crystal structure is not trimeric, the overall structure is very similar to the protomer of the
155 trimeric post-fusion state of CHAV and VSV G (Fig. 2B). Particularly, the lateral helix is
156 already formed (Fig. 2C) and the conserved residues D143, Y145 and H397 that lock the
157 hairpin-shaped post-fusion conformation are at the same place as in VSV G post-fusion
158 protomer (Fig. 2D). This is not the case in the late intermediate (LI) conformation of CHAV G
159 (Fig. 2C and 2D).

160 Structure-based sequence alignment (S1 Fig.) allowed a precise definition of the fusion
161 domain (FD), the pleckstrin homology domain (PHD) and the trimerization domain (TrD) (Fig.
162 1A, Fig. 3 and Table 2). As in vesiculovirus glycoproteins, these domains are flanked by
163 segments (R1 to R5) that refold during the low pH-induced conformational change.

164 The FD is extremely well conserved among rhabdoviruses (Fig. 3A) with two insertions
165 in MOKV G sequence (residues 113-116 and 162-166) (S1 Fig.) which are also present in other
166 lyssaviruses G (S2 Fig.). In this domain, the segment 110-117, containing sequence insertion
167 113-116, is not visible indicating that it is more flexible in lyssaviruses than in vesiculoviruses.
168 Indeed, lyssavirus glycoproteins do not have a stabilizing disulfide bridge equivalent to that
169 found at the tip of the vesiculovirus FD (between cysteine residues 68 and 114 for VSV G)
170 (Fig. 3A).

171 The structural organization of the TrD is also well conserved except for the most lateral
172 part which also contains an extra disulfide bridge in lyssavirus G (between cysteine residues
173 344 and 351) (Fig. 3B). However, the long helix, which constitutes the center of the post-fusion
174 trimer for all class III fusion glycoproteins, is bent for MOKV G, which is not the case for
175 vesiculoviruses G (Fig. 3B). This indicates that the trimerization motif of MOKV G is a coiled-
176 coil whereas it is a trimeric bundle of straight helices for vesiculovirus glycoproteins. Finally,

177 the PHD is much less conserved, a feature that was previously observed among the
178 vesiculovirus genus (25) (Fig. 3C).

179

180 **Electron microscopy reveals post-fusion trimers of MOKV G**

181 As we had not been able to observe post-fusion trimers of G_{1-436}^{**} , we made the
182 hypothesis that the formation of the post-fusion trimer would be favored after membrane
183 insertion of the fusion loops into a target membrane. Such an insertion is not possible with G_{1-436}^{**} .
184 Therefore, we used purified G_{1-436}^{WT} that we incubated with liposomes at pH 5.5 for 2
185 h at 37°C. Although, as mentioned above, G_{1-436}^{WT} samples are less pure than G_{1-436}^{**} , we
186 observed liposomes nicely decorated by G ectodomains which clearly adopt the trimeric post-
187 fusion conformation inserted in the membrane via their hydrophobic fusion loops (Fig. 4A).
188 This demonstrated that the enterokinase cleavage site and the double StrepTag, which are also
189 present in G_{1-436}^{WT} , do not impede G trimerization. Furthermore, as with VSV G
190 ectodomain(28), we observed the formation of long proteolipidic tubular structures, having a
191 diameter of ~35 nm, at the surface of which G trimers are organized in regular helical network
192 (Fig. 4B).

193 We also investigated the structure of full length wild type MOKV G (MOKV G WT)
194 and mutant MOKV G^{**} (in which the fusion loops were replaced by hydrophilic sequences as
195 in G_{1-436}^{**}) at the surface of pseudotyped VSVΔG-eGFP (Fig. 5).

196 At pH 7.5, MOKV G WT can be seen in side view on the periphery of the virions (Fig.
197 5A). The glycoproteins form a well-defined 8-nm-thick layer similar to the one previously
198 observed with RABV G(10, 11). Stain accumulation near the membrane below the head of the
199 protein was consistent with a pre-fusion state similar to the one of vesiculoviruses.

200 At pH 5.5, the virions are massively aggregated as already described for RABV(10). At
201 the surface of some isolated virions, the spikes are individualized, allowing the visualization of

202 the 12-nm-long post-fusion trimer that stands perpendicular to the membrane (Fig. 5B). In some
203 circumstances, a regular network of G can also be observed (Fig. 5B). At the surface of other
204 virions or at the periphery of the aggregates, MOKV glycoproteins appear to form a fuzzy
205 heterogeneous layer (Fig. 5B) in which some spikes have the typical post-fusion shape while
206 some others are thinner and oblique to the membrane, most probably corresponding to an
207 elongated monomer.

208 In the case of MOKV G**, the layer of G around the virion is less defined at pH 7.5
209 suggesting that the pre-fusion state is partially destabilized (Fig. 5C). However, at low pH (Fig.
210 5D), MOKV G** behaves the same way as MOKV G WT and post-fusion trimers can be
211 observed at the surface of the viral particles. This indicates that the hydrophilic sequences that
212 replace the fusion loops do not impede the formation of the post-fusion trimer.

213

214 **Antigenic sites**

215 Sequence alignment between MOKV G and RABV G ectodomain (65% amino acid
216 identity) allows the identification of the location of RABV antigenic sites (S2 Fig.).

217 RABV antigenic mutants resistant to neutralization by site II-specific MAbs have
218 mutations in position 36, 40, 42, 198 and 200 of G, which are indeed clustered at the surface of
219 the PHD (Fig. 6A). Furthermore, a mutation in position 147, located in the FD confers partial
220 or total resistance to most MAbs recognizing site II(19). Other mutations allowing resistance
221 to neutralization were located in position 34 (in the segment R1) and 184 (in the segment
222 R3)(19) (Fig. 6A). Repositioning MOKV G domains on VSV G pre-fusion structure (Fig. 6B)
223 shows that antigenic site II is located at the top of the molecule in its pre-fusion conformation
224 at the viral surface, which certainly explains why it is the major antigenic site of RABV G(14)
225 (Fig. 6B-C). The fact that site II includes residues belonging to distinct domains and segments

226 R1 and R3 that refold during the structural transition explains why MAbs directed against this
227 site are unable to recognize the protein in its post-fusion conformation.

228 RABV antigenic mutants resistant to neutralization by site III-specific MAbs have
229 amino acid substitutions clustered in position 330, 333, 336 and 338 of G (20, 21) which are
230 located at the surface of the TrD (Fig. 6A) near the top of the molecule in its pre-fusion
231 conformation (Fig. 6B-C). Several RABV mutants in position 333 have an avirulent phenotype
232 (20, 21) and the presence of a lysine and an arginine respectively in position 330 and 333 of
233 RABV G is required for virus penetration into the neurons of adult mice(22). Interestingly, in
234 the model of the MOKV G pre-fusion state based on VSV G, those residues (K330 and D333
235 for MOKV G) are near the interaction site with CR domains from members of the low density
236 lipoprotein receptor (LDL-R) family(29) which are VSV receptors(30) (Fig. 6D). This is
237 consistent with the idea that RABV residues K330 and R333 are involved in RABV receptor(s)
238 recognition.

239 A minor site (minor site a) had also been identified(14). Mutants escaping neutralization
240 by MAbs recognizing this minor site were shown to have amino acid substitutions at position
241 342 and 343 (Fig. 6A). Despite their proximity, there is no overlap between site III and minor
242 site a(14). This might be explain by the kink in the polypeptide chain induced by the proline in
243 position 340.

244 Several other MAbs recognize linear epitopes contained in the region 223-285(18, 23).
245 Among those MAbs, the best characterized is certainly MAb 17D2(18) which recognizes both
246 denatured G and its pre-fusion state(31) and has been shown to recognize region 255-280(18).
247 Its epitope largely overlaps with the segment R4 of the post-fusion long helix (S1 Fig.) that has
248 no canonical secondary structure in the pre-fusion state (Fig. 6C).

249 Finally, a few MAbs bind only the post-fusion state of RABV G at the viral surface(17,
250 32). Their epitopes are located in the N-terminal part of the TrD and neutralization escape

251 mutants have amino acid substitutions in position 10, 13 and 15(17, 32) which are located at
252 the top of the post-fusion conformation (low pH site on Fig. 6A). The change of orientation of
253 TrD after the conformational change (Fig. 6B) explains why those MAbs are unable to
254 recognize RABV G in its pre-fusion conformation at the viral surface while still being able to
255 bind detergent-solubilized G whatever its conformational state(31, 33).

256

257 **pH sensitive molecular switches.**

258 The long helix, which constitutes the center of the post-fusion trimer, contains several
259 acidic residues (D263, D266, E267, E269, E274, D275, E281, E282, D285, E288) (Fig. 7A).
260 Such residues have been shown to play the role of pH sensitive molecular switches in VSV
261 G(34).

262 Inside a protomer, D275 is facing H384 (located in the lateral helix of R5) making an
263 interaction that stabilizes the post-fusion state (Fig. 7B). E269 is facing D211 (located in the
264 PHD) and the deprotonation of their side chain at high pH induces a repulsive force that may
265 contribute to the structural transition back to the pre-fusion state (Fig. 7C). Finally, residue
266 H261 that is positively charged at low pH is sandwiched between the acidic residues D266 and
267 E45 (Fig. 7C). It is worth noting that residues D275, H384, E269, D211, D275, D266, H261,
268 D266 and E45 are all conserved among the lyssavirus genus (with the exception of Irkut virus
269 for which the residue in position 269 is an alanine) (S2 Fig.).

270 The central helix is amphiphilic with its acidic residues mostly located on the solvent-
271 exposed face and its hydrophobic residues contributing to the overall stability of the protomer
272 (Fig. 7D). Therefore, the interface that is used for trimerization is essentially composed of acidic
273 residues. Remarkably, residues D263, E267, E274, E281, D285 and E288 are aligned on the
274 same side of the helix (Fig. 7D). We reconstruct MOKV G post-fusion trimer by modelling the
275 arrangement of the helices at the trimeric interface. For this purpose, we superimposed them on

276 a GCN4 coiled-coil (35, 36)(Fig. 7E), In this model of the post-fusion trimer, there are no steric
277 clashes between subunits (which is not the case when we used VSV G post-fusion trimer as a
278 model) (S3 Fig.). We observed that the acidic residues that are aligned on the helix indeed point
279 toward the trimer axis (Fig. 7E). Therefore, they have to be protonated to stabilize the post-
280 fusion trimer through hydrogen bonds. At high pH, they are negatively charged and the post-
281 fusion trimer interface cannot be stable.

282

283

Discussion

284

285

286 The X-ray structure of MOKV G₁₋₄₃₆** in its post-fusion state described here provides
287 insights in the architecture of the lyssaviruses glycoproteins. The comparison with VSV G and
288 CHAV G reveals that the global fold of G is well conserved across the rhabdovirus family. The
289 PHD, which contains antigenic site II, is by far the most divergent domain. In the TrD, the helix
290 and its adjacent β -sheet, which constitute the internal part of the trimeric structures, are much
291 more conserved than the lateral part, which is solvent-exposed and contains antigenic site III.
292 Globally, the structure reveals that the major antigenic sites are located in the top of the
293 molecule in its pre-fusion conformation and that, at the surface of the virion, they are very
294 accessible to antibodies. Their low conservation (compared to the rest of G sequence) also
295 indicates that the humoral response is at the origin of the diversification of rhabdovirus
296 glycoprotein architecture. In keeping with this idea, the FD is very conserved and does not
297 contain antigenic sites. In fact, the spikes organization at the surface of rhabdoviruses at high
298 pH, and particularly the dense layer they form for lyssaviruses, protects the FD from being a
299 target for the humoral response.

300

301 The presence of a lysine and arginine in positions 330 and 333 respectively of RABV
302 G is required for both RABV G interaction with the low-affinity nerve-growth factor receptor
303 (P75NTR) (6) and RABV penetration into the neurons of adult mice (22). In the model of the
304 pre-fusion state based on VSV G, residues K330 and D333 of MOKV G are in the vicinity of
305 the VSV G interaction site with CR domains from members of the LDL-R family (29) (Fig.
306 6D). This suggests that the same region of G is used by rhabdoviruses to bind their receptor. As
307 this region is part of antigenic site III, this suggests that the humoral immune response also
308 contributes to receptor diversification among the rhabdovirus family. Supporting this notion, it
has been shown that MOKV G does not recognize P75NTR (37).

309 Although MOKV G has been crystallized in a monomeric conformation, EM reveals
310 that, at low pH, it clearly adopts a trimeric post-fusion conformation at the viral surface. This
311 indicates that for both lyssaviruses and vesiculoviruses, the trimer is unstable, which is in
312 agreement with the model that for rhabdoviruses, the structural transition proceeds through
313 monomeric intermediates(27, 38).

314 In the case of VSV G, on the central helix, there is a single acidic (D268) residue
315 pointing toward the trimer axis(24, 34). For MOKV G, there are six acidic residues, placed all
316 along the central helix at the positions classically occupied by leucine and isoleucine in
317 canonical heptad repeats. Those residues are largely conserved among lyssaviruses (S2 Fig.).
318 They must be protonated in the post-fusion trimer as their deprotonation at high pH immediately
319 induces repulsive forces that destabilize the trimeric interface. Their pKa is certainly shifted
320 toward higher values due to their environment in the post-fusion trimer. As a consequence, the
321 post-fusion form still makes up the majority of the population up to pH 6.4(10, 13). These
322 higher pKa values when G is in the trimeric post-fusion conformation explains the strong
323 cooperativity of the structural transition when the pH is lowered(13).

324 EM experiments reveal the ability of MOKV G to form a network at the virion surface
325 when it adopts its post-fusion trimeric conformation. Such a behavior has been also observed
326 for VSV G (28, 34). The lateral interactions leading to the network formation involve probably
327 contacts between the top of the molecules in their post-fusion conformation. They do not require
328 the presence of the transmembrane or intraviral domain as, at low pH, MOKV G ectodomain is
329 independently able to self-associate into a quasi-crystalline array at the surface of liposomes
330 forming elongated proteolipidic tubes very similar to those formed by VSV G ectodomain (28).
331 This, once again, reveals the ability of rhabdovirus glycoproteins to deform membranes. This
332 low pH-induced local reorganization of the glycoprotein network at the surface of the virion,
333 outside the contact zone with the target membrane, might drive pore enlargement as suggested

334 for VSV G (28). The formation of such networks of spikes in their post-fusion conformation is
335 very general among class III fusion glycoproteins as it has been also observed with pseudorabies
336 virus fusion glycoprotein gB (39). It is also reminiscent of the behavior of class II fusion
337 glycoproteins, which, in their post-fusion conformation, form more or less regular networks
338 that are different from their initial icosahedral organization (40-42).

339 In conclusion, this work describes the first structure of a lyssavirus glycoprotein, which
340 paves the way for the development of a pan-lyssavirus vaccine. Furthermore, RABV G is
341 largely used for transneuronal tracing and studies of monosynaptic connections(43, 44). The
342 knowledge of MOKV G structure may be useful to improve the available tools in this field.

343

344

345 **Material and methods**

346

347 **Chemicals**

348 Phosphatidylcholine (PC; type XVI-E from egg yolk), phosphatidylethanolamine (type IV from
349 soy bean), Cholesterol (Chol; standard for chromatography) and Sphingomyelin (SM; from
350 chicken egg yolk) were supplied by Sigma-Aldrich. Tb-Xo4 was purchased from Polyvalan
351 Lyon, France (45).

352

353 **Cells and viruses**

354 HEK-293T (human embryonic kidney cells expressing simian virus 40T antigen; ATCC
355 CRL-3216) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented
356 with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were maintained at 37 °C in a humidified incubator with
357 5% CO₂. Drosophila Schneider 2 (S2) cell line (Invitrogen) were grown in synthetic Express
358 Five SFM media (Gibco) supplemented with 20 mM L-Glutamine and 50 U/mL of penicillin
359 and 50 µg/mL of streptomycin. Cells were maintained at 28°C.

360 VSVΔG-eGFP is a recombinant VSV which was derived from a full-length cDNA clone
361 of the VSV genome (Indiana serotype) in which the coding region of the G protein was replaced
362 by a modified version of the GFP gene and pseudotyped with the VSV G protein (34, 46, 47).
363 VSVΔG-eGFP is propagated on HEK-293T cells that have been previously transfected with
364 pCAGGS-VSV G.

365

366 **Plasmids and cloning**

367 Genes encoding MOKV G WT (GenBank: Y09762.1) and MOKV G** (in which the
368 hydrophobic fusion loops ⁷⁴FVGY⁷⁷ and ¹²¹WL¹²² have been replaced by more hydrophilic
369 sequences ⁷⁴GNGS⁷⁷ and ¹²¹GS¹²²) were ordered from Eurofin Genomics. For transient

370 expression in HEK-293T cells, MOKV G WT and MOKV G** genes were subcloned into
371 pCAGGS vector using Gibson assembly reaction kit (New England Biolabs). For stable
372 expression in S2 cells, the ectodomain sequences MOKV G₁₋₄₃₆ WT and MOKV G₁₋₄₃₆**
373 were subcloned into the expression vector pT350 (48) using Gibson assembly reaction kit (New
374 England Biolabs) so that MOKV G ectodomains are flanked by the *Drosophila* Bip secretion
375 signal at the N-terminus and an enterokinase-cleavable double StrepTag at the C-terminus
376 (sequence: DDDDKAGWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSSWSHPQFEK).

377

378 **MOKV G₁₋₄₃₆ production and purification**

379 As explained in Backovic and Krey (48), stable cell lines expressing the MOKV G₁₋₄₃₆
380 WT or MOKV G₁₋₄₃₆** proteins with a C-terminal tandem StrepTag were generated by
381 cotransfecting S2 cells with a plasmid encoding MOKV G₁₋₄₃₆ WT or MOKV G₁₋₄₃₆** in a
382 pT350 vector and a plasmid encoding the puromycin resistance gene. To produce MOKV G₁₋₄₃₆
383 WT or MOKV G₁₋₄₃₆** in large quantities, the S2 cells were grown in suspension at 28°C,
384 120 rpm until reaching $1.5 \cdot 10^7$ cells/ml in media supplemented with 7µg/ml puromycin. The
385 cell culture was then diluted 2 times and induced with 500µM of CuSO₄. The culture was
386 harvested 5 days after induction and the supernatant was concentrated by tangential filtration
387 (Vivaflow 200, VWR). MOKV G₁₋₄₃₆ WT or MOKV G₁₋₄₃₆** were purified thanks to their
388 StrepTag, on a streptavidin affinity column (streptrap, GE Healthcare) in a 20 mM Tris-HCl
389 pH 8 buffer, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA. Elution is carried out in the same buffer to which 3
390 mM α-Desthiobiotin is added. For MOKV G₁₋₄₃₆**, an additional purification step was
391 performed on a size exclusion chromatography (Superdex 200 increase column 10/300 -GE
392 Healthcare-) equilibrated in 20mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 2mM EDTA. Purified
393 MOKV G₁₋₄₃₆ WT or MOKV G₁₋₄₃₆** are concentrated (Amicon Ultra 30kDa c / o -Millipore-
394) and stored at -80°C.

395

396 Preparation of pseudotypes

397 HEK-293T cells at 80% confluence were transfected by pCAGGS encoding MOKV G WT or
398 MOKV G WT ** using PEI Max (Polyscience). At 24 h after transfection, cells were infected
399 with VSV Δ G-eGFP, pseudotyped with VSV G at an MOI of 1. Two hours p.i., cells were
400 washed to remove residual viruses from the inoculum. Cell supernatants containing the
401 pseudotyped viral particles were collected at 16 h p.i. Viral particles were purified and
402 concentrated as previously described (28).

403

404 Preparation of liposomes

405 We mixed 250 μ g of PC, 250 μ g of PE, and 250 μ g of SM and 375 μ g of Chol dissolved in
406 organic solvents, and dried the mixture under vacuum. The lipid film was resuspended in 1 ml
407 of buffer (5 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl). The mixture was subjected to three cycles of
408 freezing/thawing in liquid nitrogen and then sonicated in a water bath for 20 min.

409

410 Negative staining electron microscopy

411 Purified pseudotyped virions were diluted in 20 mM HEPES pH 7.5 and 150 mM NaCl.
412 The pH was progressively lowered pH by dialyzing virions overnight at 37°C against the same
413 buffer in which 100 mM Ammonium Acetate pH 5.5, 375 mM NaCl was gradually added.
414 Samples at pH 7.5 or 5.5 were adsorbed onto airglow discharge carbon-coated grids and stained
415 with sodium phospho-tungstic acid adjusted to the sample pH.

416 Purified MOKV G₁₋₄₃₆** and VSV G_{th} (purified as in (28)) were diluted in 150 mM
417 NaCl in either 50 mM Tris-HCl pH 7.5, or 50 mM MES at pH 5.5. Proteins were then adsorbed
418 onto grids and stained with sodium phospho-tungstic acid adjusted to the sample pH.

419 Purified MOKV G₁₋₄₃₆ WT was incubated with liposomes at 37°C in 150 mM NaCl, 50
420 mM MES at pH 5.5. The mixture were then adsorbed onto grids and stained with sodium
421 phospho-tungstic acid adjusted to the sample pH or uranyl acetate (pH 4.5).

422 Images were recorded in an electron microscope Tecnai Spirit (FEI) operated at 100kV.

423

424 **Crystallization and structure determination**

425 Initial crystallization screen was performed at 20 °C by sitting drop vapor diffusion (100 nl
426 protein and 100 nl mother liquor) in 96-well TTP plates (Corning) using a Mosquito robot.

427 Crystals of MOKV G₁₋₄₃₆** were grown in hanging drops containing equal volumes (1 µL) of
428 purified proteins and reservoir solution (12% PEG 4000, 100 mM HEPES pH 7.5, 100 mM
429 Sodium acetate) in presence of 10 mM Tb-Xo₄ crystallophore. Crystals were observed after 3-
430 5 days and matured to full size within two weeks. Crystals were soaked into mother liquor
431 supplemented with 35% (v/v) glycerol for cryo-protection. Crystals were plunged into liquid
432 nitrogen and measured at the SOLEIL synchrotron beam line PROXIMA-1. A single data set
433 was collected at 100 K at the terbium LIII absorption edge on a single crystal up to 2.9 Å
434 resolution.

435

436 **Structure determination and refinement**

437 Diffraction data were integrated and reduced using XDS program package(49). The crystals of
438 MOKV G₁₋₄₃₆** belonged to C2221 space group. We used the terbium anomalous signal of
439 Tb-Xo₄(III) used in cocrystallization to solve the structure by SAD method. A unique molecule
440 was found in the asymmetric unit, with a solvent content of 62%, and six Tb-Xo₄ were found.
441 Initial phases and model were obtained using the SHELX C/D/E suite of programs(50).
442 Subsequently, phases were calculated using PHASER (51)and improved by solvent flattening
443 using PARROT(52). Improved models were automatically built using Buccaneer (52) and then

444 iteratively rebuilt using COOT (53) and refined using Phenix(54). The details of the
445 crystallographic analysis are presented in Table 1. Structure representations were made using
446 PyMol (PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA.
447 <http://www.pymol.org>).

448

449

450

Acknowledgements

451

452 This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR CE11
453 MOBARHE) to YG. We acknowledge synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France) for
454 providing radiation facilities. We acknowledge the Structural biology pole of the IMAGIF
455 integrated platform (<https://www.imagif.cnrs.fr/?nlang=en>) for access to Crystallization and
456 electron microscopy facilities. The work was financially supported by the French Infrastructure
457 for Integrated Structural Biology Initiative (FRISBI, ANR-10-INSB-05-02). LB had a PhD
458 grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

459

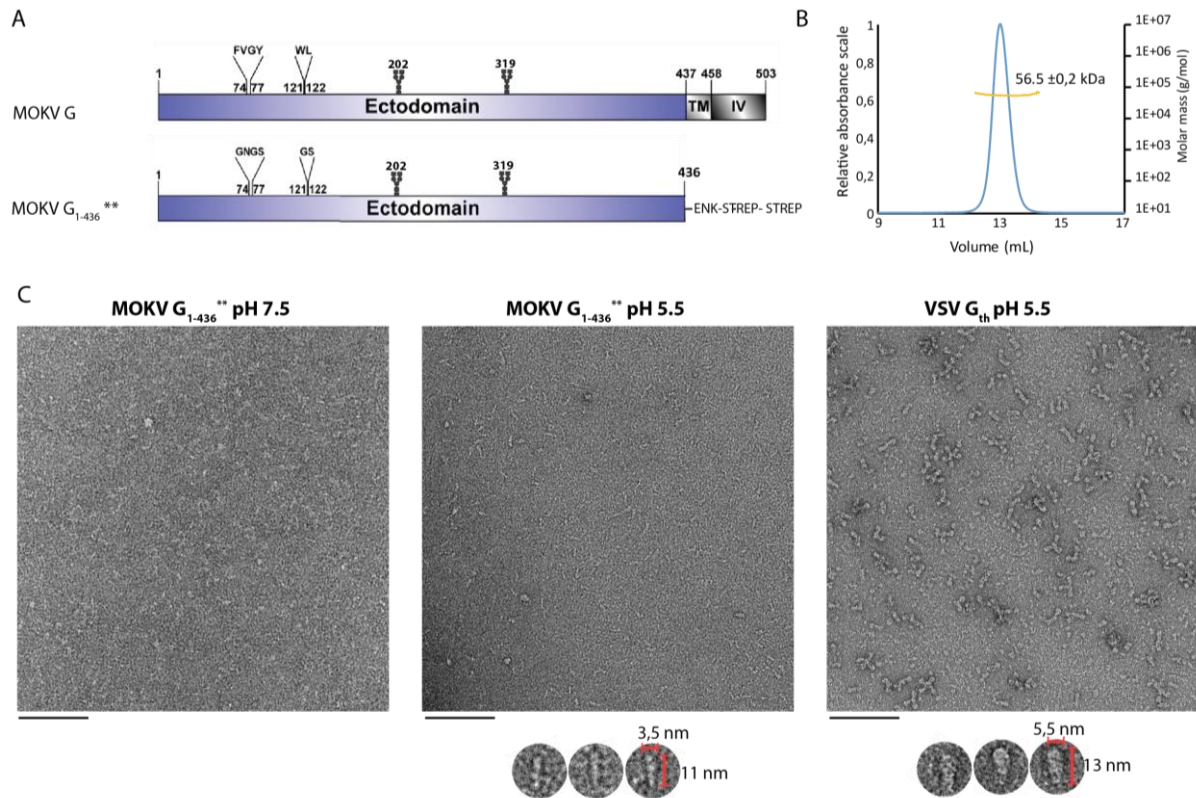
460

461

462

463

Figure and Legends



464

465

466 **Fig. 1:** Construction, purification and characterization of MOKV G₁₋₄₃₆**

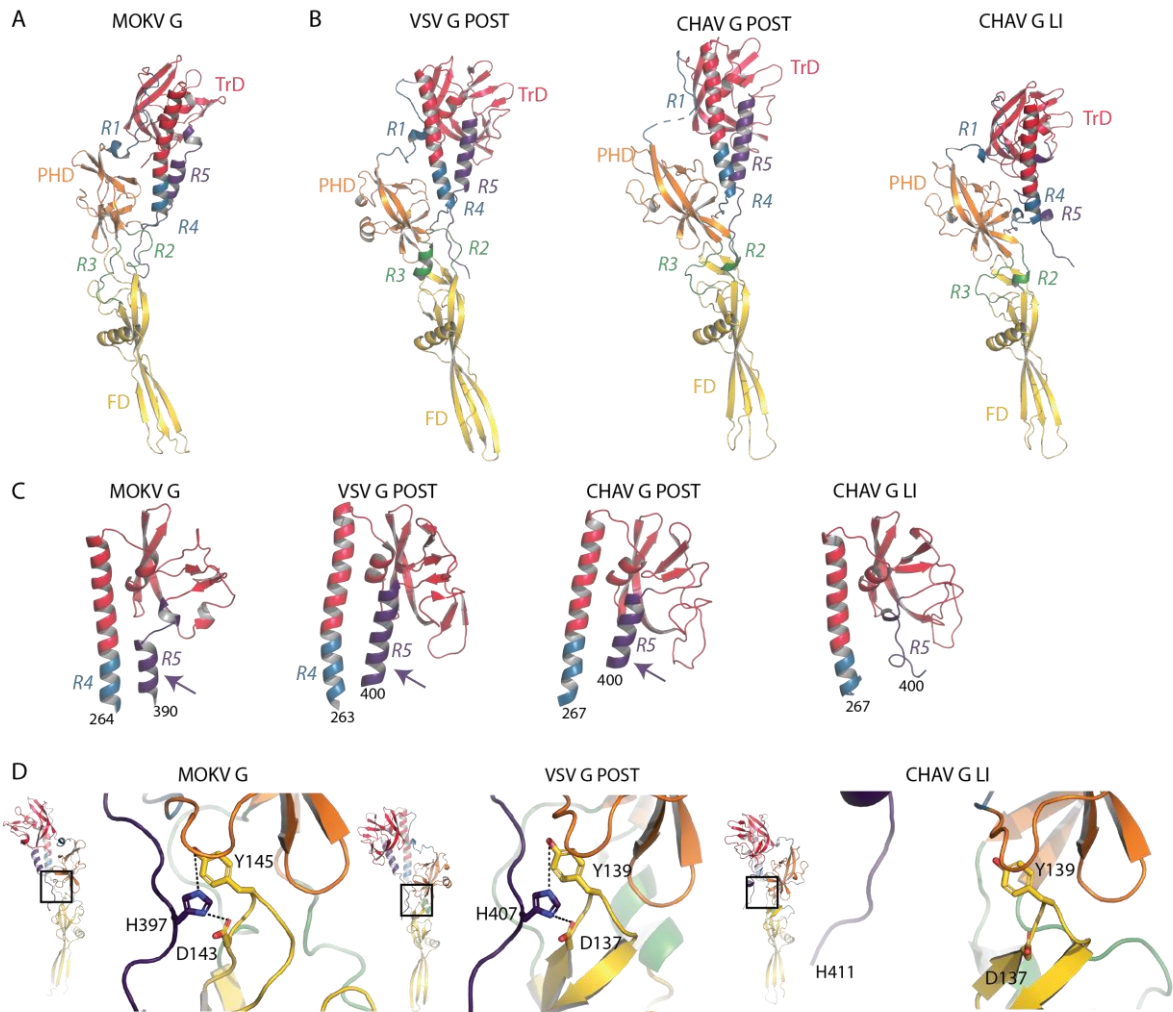
467 A) Bar diagram showing the organization of MOKV G and G₁₋₄₃₆** . The N-glycosylation sites
 468 are indicated as well as the two fusion loops in G and the hydrophilic sequences that replace
 469 them in G₁₋₄₃₆** . TM: Transmembrane domain ; IV: Intraviral domain ; ENK: enterokinase
 470 cleavage site ; STREP: StrepTag

471 B) Molecular mass of MOKV G₁₋₄₃₆** determined by SEC-MALS.

472 C) Electron microscopy on negatively stained MOKV G₁₋₄₃₆** at pH 7.5 and 5.5 and VSV G_{th}
 473 at pH 5.5. At pH 7.5, no defined molecular shape of MOKV G₁₋₄₃₆** can be identified. At pH
 474 5.5, elongated structures can be distinguished as shown in the gallery below the micrograph.
 475 These structures are thinner than those observed with the post-fusion G_{th} trimers.

476 Scale bar: 100nm.

477



478

479 **Fig. 2:** Structure of MOKV G₁₋₄₃₆** compared to post-fusion conformation of VSV and CHAV480 G_{th} and to the late intermediate (LI) conformation of CHAV G_{th}481 A) Ribbon representation of the structure of MOKV G₁₋₄₃₆** colored by domains following the
482 color code indicated in Table 2.483 B) Ribbon representation of the structures of a protomer of the trimeric post-fusion
484 conformations of VSV and CHAV G_{th}, and of the monomeric CHAV G_{th} LI colored by domains
485 following the same color code as for MOKV G₁₋₄₃₆**.

486 In A) and B) the glycoproteins are aligned on their fusion domain.

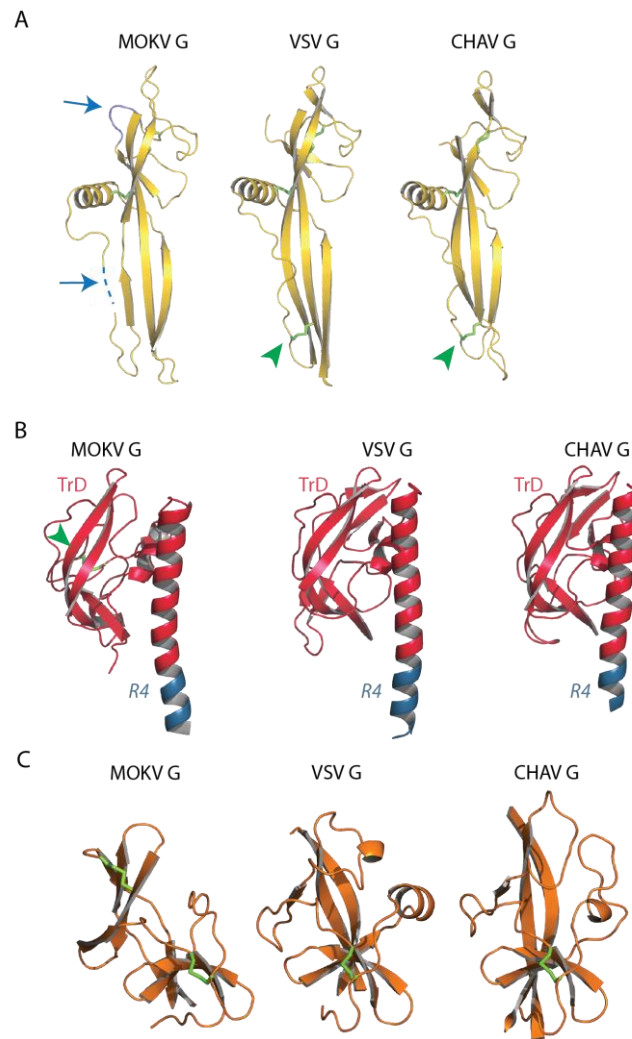
487 C) Structure of TrD and segments R4 and R5 in MOKV G₁₋₄₃₆**, in a protomer of the trimeric
488 post-fusion conformation of VSV and CHAV G_{th} and in monomeric CHAV G_{th} LI. The arrows

489 indicate the lateral helix that is present in the post-fusion conformation but not in LI
490 conformation.

491 D) Close-up view on the triad D143, Y145 and H397 of MOKV G₁₋₄₃₆** that locks the hairpin-
492 shaped post-fusion conformation and on their counterpart in the post-fusion protomer of VSV
493 G_{th} and in CHAV G_{th} LI.

494

495



496

497

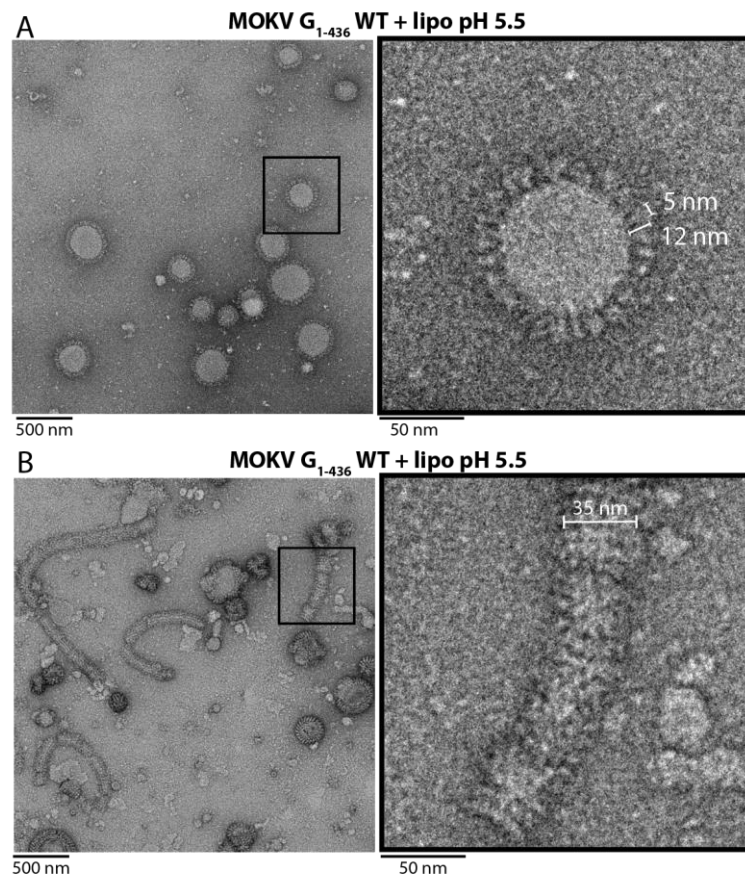
498 **Fig. 3:** Comparison of the structure of MOKV G domains with those of VSV and CHAV G.

499 A) Comparison of FDs of MOKV, VSV and CHAV G. Blue arrows indicate additional
 500 segments present in all lyssaviruses G. The dotted line represents the missing segment in
 501 MOKV G structure. Green arrowheads indicate the disulfide bridge present in vesiculoviruses
 502 G but not in lyssaviruses G.

503 B) Comparison of TrDs and R4 segment of MOKV, VSV and CHAV G. Note that MOKV G
 504 helix is bent whereas it is rather straight for CHAV G and VSV G. The green arrowhead
 505 indicates the extra disulfide bridge of lyssaviruses G.

506 C) Comparison of PHDs of MOKV, VSV and CHAV G.

507



508

509

510 **Fig. 4:** Electron microscopy of MOKV G₁₋₄₃₆ WT incubated with liposomes at pH 5.5.

511 A) MOKV G₁₋₄₃₆ WT is inserted in liposomes in a typical trimeric post-fusion conformation.

512 The sample was stained with sodium phosphotungstate (NaPT).

513 B) MOKV G₁₋₄₃₆ WT forms a network favoring the formation of tubular structures. Although

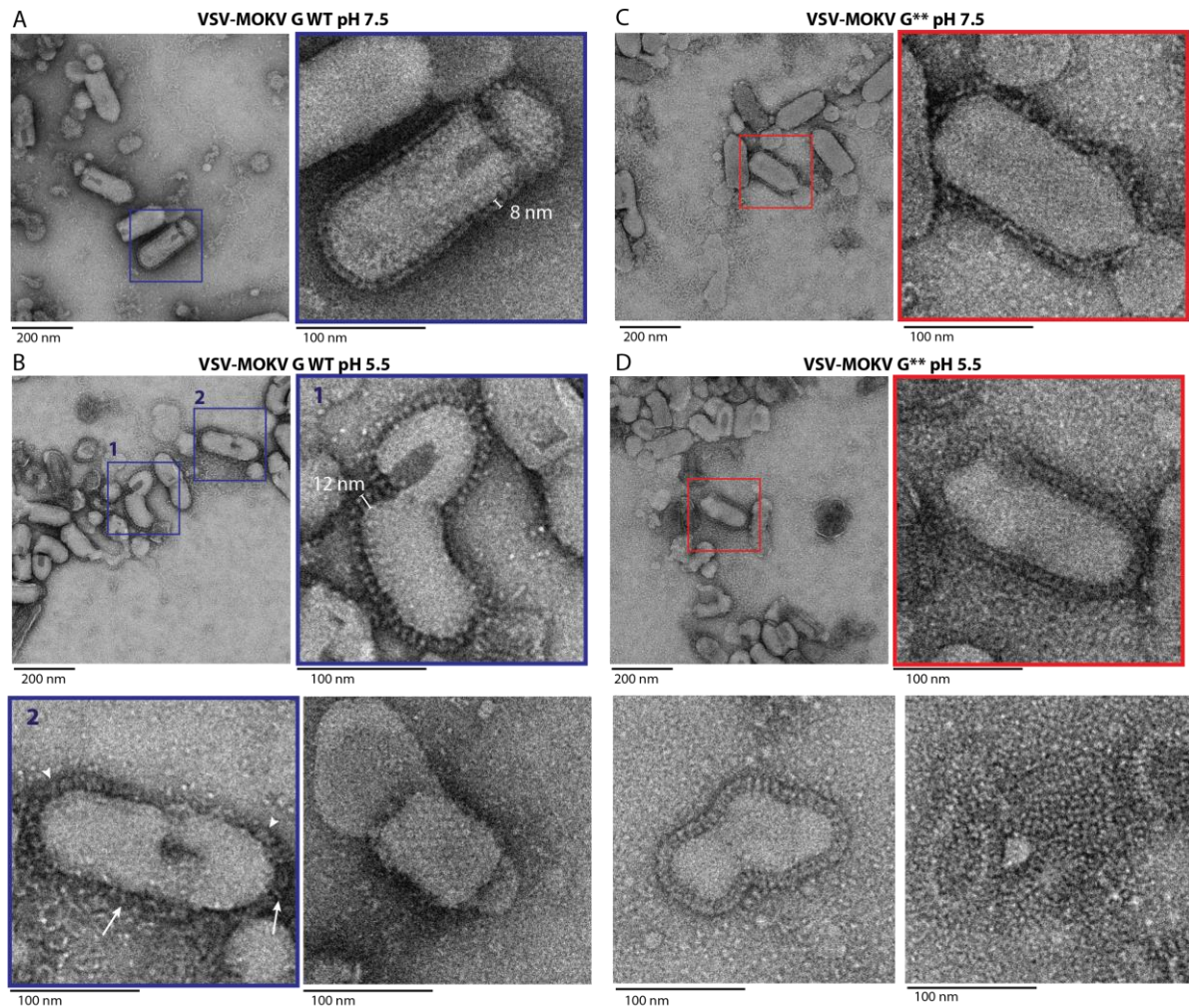
514 these proteolipidic tubes are also seen after NaPT staining, they are more easily observed with

515 uranyl acetate staining that has been used for the micrograph presented in this panel.

516

517

518



519

520 **Fig. 5:** Electron microscopy of VSVΔG-eGFP pseudotyped either by MOKV G WT or MOKV
 521 G**.

522 A) At pH 7.5, VSV-MOKV G WT exhibits a 8-nm-dense layer of glycoproteins at its surface.

523 B) At pH 5.5, some VSV-MOKV G WT virions exhibit 12-nm-long individualized spikes
 524 corresponding to the post-fusion trimer that stands perpendicular to the membrane (inset 1). At
 525 the surface of some other virions, MOKV G WT appear to form a fuzzy heterogeneous layer in
 526 which some spikes have the typical post-fusion shape (arrowheads) while some others are
 527 thinner and oblique to the membrane (arrows), most probably corresponding to elongated
 528 monomers (inset 2). A regular network of G can also be observed (bottom right micrograph).

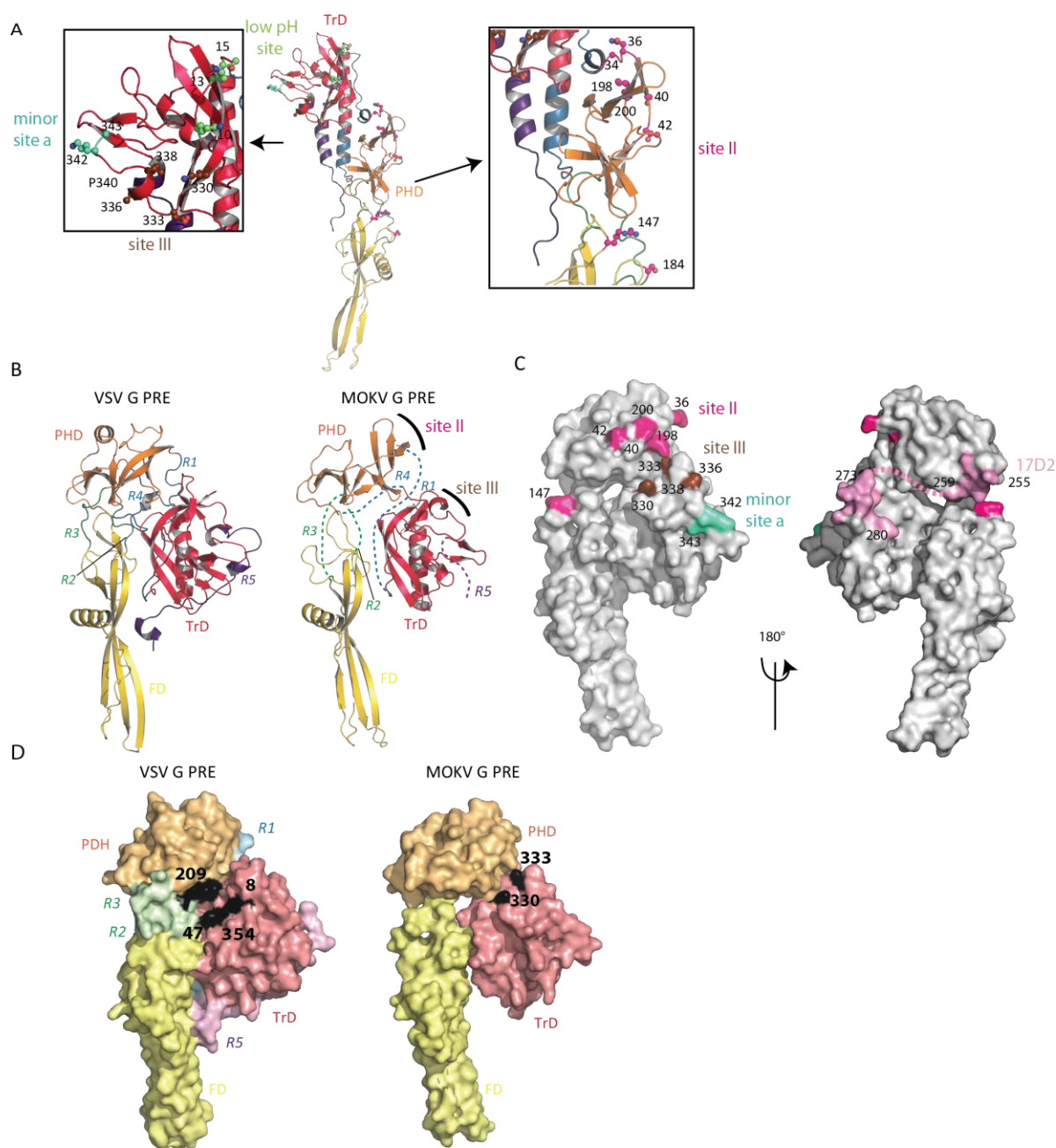
529 C) At pH 7.5, at the surface of VSV-MOKV G**, the layer of MOKV G** around the virion
 530 is less defined than at the surface of VSV-MOKV G WT.

531 D) At pH 5.5, post-fusion trimers are observed at the surface of VSV-MOKV G** (inset and
532 bottom left micrographs). As with VSV-MOKV G WT, a regular network of MOKV G** can
533 be observed at the surface of some disrupted virions (bottom right micrograph).

534

535

536



537

538 **Fig. 6:** Antigenic sites or RABV positioned on MOKV G structure

539 A) Location of major antigenic sites II and III, minor antigenic site a and low pH antigenic site.

540 Residues that are found substituted in mutants escaping neutralization by MAbs are indicated

541 by their number and represented in ball and sticks form. They are colored in magenta for site

542 II, in brown for site III, in cyan for minor site a and in green for low pH antigenic site. Proline

543 340, which separates site III and minor site a, is also indicated.

544 B) Model of MOKV G pre-fusion generated by superimposing MOKV G PHD, TrD and FD
545 domains on the corresponding domains of VSV G. The location of major antigenic site II and
546 III are indicated on the model.

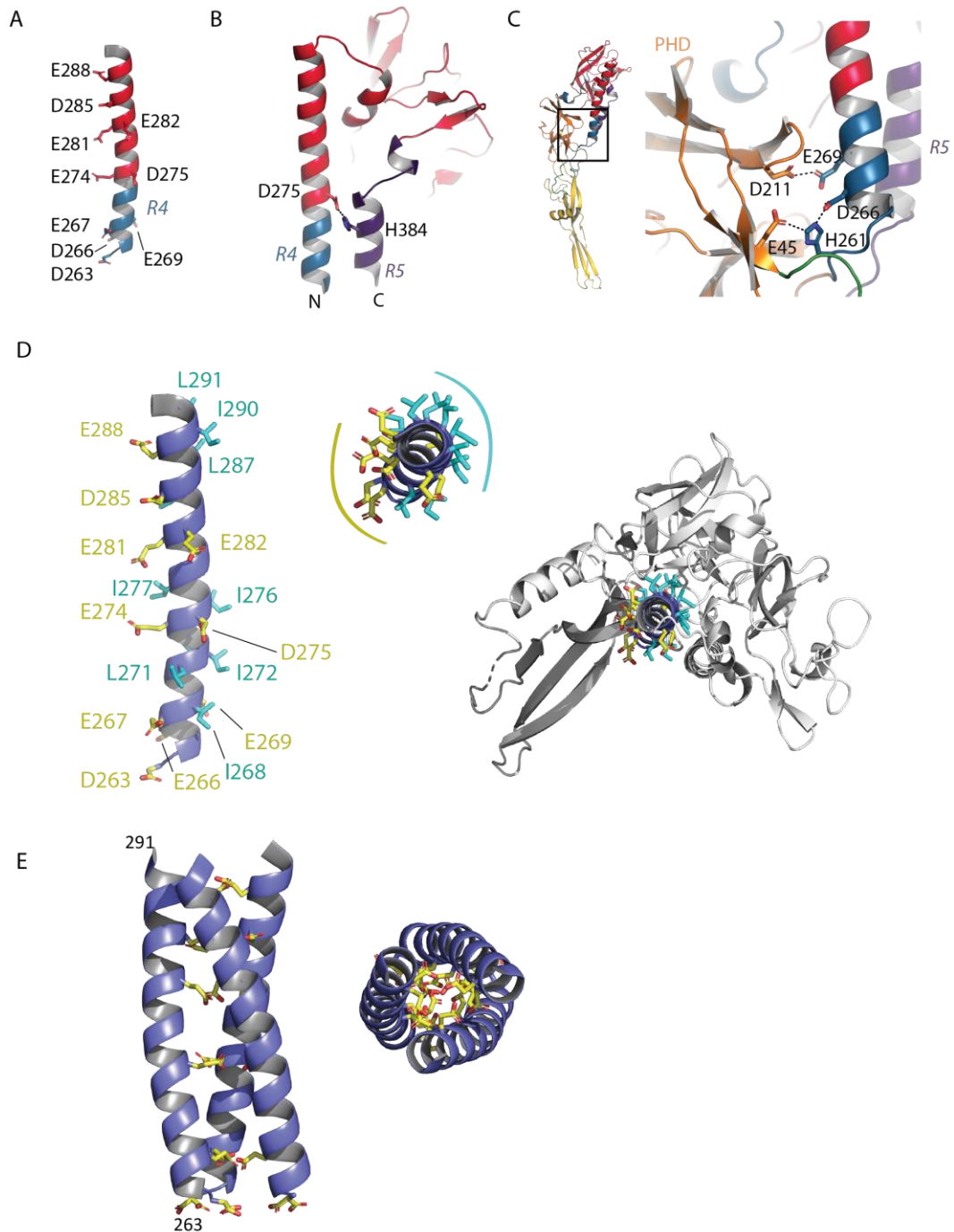
547 C) Surface representation of the modelled MOKV G pre-fusion state. Residues that are found
548 substituted in mutants escaping neutralization by MAbs are indicated by their number and
549 colored with the same color code as in A. The epitope of Mab 17D2 is colored in pink. Segment
550 R4, which is part of the epitope and of which the pre-fusion conformation is unknown, is
551 indicated by a pink dotted line.

552 D) Surface representation of VSV G and modelled MOKV G pre-fusion states. The footprint
553 of LDL-R CR2 domain on VSV G pre-fusion conformation is in black (with key residues for
554 binding indicated by their number). The location of residues 330 and 333, required for RABV
555 penetration into neurons of adult mice, are also indicated in black at the surface of MOKV G.
556 Both molecules have the same orientation.

557

558

559



560

561 **Fig. 7:** pH sensitive molecular switches in MOKV G

562 A) Position of acidic residues on the TrD long helix.

563 B) Lateral view of the TrD and segments R4 and R5 showing the interaction between D275 and

564 H384 stabilizing the post-fusion state of MOKV G.

565 C) Close up view on the pair of acidic residues (D211 in PHD and E269 in R4) facing each
566 other in the post-fusion conformation of MOKV G and on the environment of H261 (in R4)
567 which is sandwiched by D266 (in R4) and E45 (in PHD).

568 D) View of the TrD long helix showing the disposition of hydrophobic (in cyan) and acidic (in
569 yellow) residues. Residues D263, E267, E274, E281, D285 and E288 are aligned on the same
570 side of the helix of which the top view reveals the amphiphilic character. On the right, the top
571 view indicate that the hydrophobic residues are buried in the structure and contribute to its
572 overall stability.

573 E) Model of the arrangement of the helices at the trimeric interface. The helix were
574 superimposed on a GCN4 coiled-coil (35, 36). In this model, the acidic residues that are aligned
575 on the helix point toward the trimer axis.

576

577

MOKV G E F R L Y T I R E K I E K W T P I D M I H L S C P N N L L S E E E G N A E S S F T Y F E L R S G Y L A H Q K V P G F T C T G V V N E A E Y T N F V G Y V T T F K R
 LBV G D F R L Y T I R E K I G P W T P I Q L I H L S C P N N L Q S E D E G C T S S V F S V E L K T G Y L T H Q K V S G F T C T G V V N E A V Y T N F V G Y V T T F K R
 RABVC G K F R I Y T I R D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V V E D E G C T N L S E F S Y M E L K V G Y I S A I K V N G F T C T G V V T E A E Y T N F V G Y V T T F K R
 DUVV G K F R I Y T I R D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V V E D E G C T T L T P F S Y M E L K V G Y I T S I K V S G F T C T G V V T E A E Y T N F V G Y V T T F R R
 EBLV2 G K F R I Y T I R D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V V E D E G C T T L T V F S Y M E L K V G Y I T T I K V N G F T C T G V V T E A E Y T N F V G Y V T T F K R
 EBLV1 G K F R I Y T I R D K I G P W S P I D I N H L S C P N N L I V E D E G C T T L T P F S Y M E L K V G Y I T T I K I E G F T C T G V I T E A E Y T N F V G Y V T T F K R
 IRKV G K F R I Y T I R D K I G P W S P I D I N H L S C P N N L E V E D E G C T T L T A F N Y M E L K V G Y I T S I K V D G F T C T G V V T E A E Y T N F V G Y V T T F K R
 KHUV G K F R I Y T I R D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V V E D D G C T T L S G F T Y M E L K V G Y I T T I K V D G F T C T G I V T E A E Y T N F V G Y V T T F K R
 ARAV G K F R I Y T I R D K I G P W S P I D I N H L S C P N N L V V E D E G C T T L T A F S Y M E L K V G Y I T T I K V S G F T C T G V V T E A E Y T N F V G Y V T T F R R
 WCBV G L F R L Y T I R D H L G P W T P I Q L S H L H C P N N L Y T D A S Y C T T E Q S I T Y T E L K V G S V S V S Q I P G F T C T G V R T E S V Y T N F V G Y V T T F K K

MOKV G K H F R P T V A A C R D R Y N W I V S G D P R Y E E S L H T P Y P D S S W L R T V T T T K E S L L I I S P S I V E M D I N G R T H S P M F P S G V S N V Y P S V P S
 LBV G K H F K P T A L A C R D A Y H W K I S G D P R Y E E S L H T P Y P D S S W L R T V T T T K E S L V I I S P S I V E M D V S R T H S P M F P T G T S R F Y P S S P S
 RABVC G K H F R P T P D A C R A A Y N W M A G D P R Y E E S L H N P Y P D Y H W L R T V R T T K E S L I I S P S V D L D P D K S H S R V F P G G K S G I T V S S T Y
 DUVV G R H F R P S V N S C R D R Y N W I A G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V K T T K E S L L I I S P S V A D M D A D K K Y S K I V S N G R S E I S P G S P F
 EBLV2 G K H F R P S P S A C R D A Y S W T A G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T K E S V L I I S P S V A D M D A D K T Y S K I F L N G K S G V S Q S P F
 EBLV1 G K H F R P T V S A C R D A Y N W I T G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V K T T K E S L L I I S P S V V D M D A D K N Y S K M F P N G K L A S P P S A I C
 IRKV G K H F R P N V S A C R A A F S W T A G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T K E S L L I I S P S V V D M D A D K T Y S K M F P N G K F P P I S D S P F
 KHUV G K H F R P G P S A C R D A Y N W A A G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T K E S L L I I S P S V V D M D A D K S L S K I F P N G K P G V S I A S P F
 ARAV G K H F R P T A S A C R E A Y N W A T G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V K T T K E S L L I I S P S V A D M D A D K A Y S K I F P N G K L G V S L S S P F
 WCBV G K H F P K S R D C R E A Y E R K A G D P R Y E E S L A H P Y P D S N W L R T V T T T K D S W V I E S V V E L D I T S A Y S P L F K D T S K S R T Y S P Y

MOKV G C E T N H D Y T L W L F E D P S L S L V D I F T S I N G R K A M N G S R I C G F K D E R G F Y R S L K G A K L T L C G R P G I R L F D G T W S F T K P D V H V W
 LBV G C A T N H D Y T L W L P D D P N L S L A C D I F V T T G K K S M N G S R M C G F V D E R G Y Y R T I K G A K L T L C G K P G L R L F D G T W I S F P R P E V T T R
 RABVC G C S T N H D Y T I W M P E N P R P R T P C D I F T N S R G K R A S K G N K T C G F V D E R G L Y K S L K G A R L R L C G V L G L R L M D G T W V A M Q T S D E T K W
 DUVV G C P T N H E Y T I W M P E S S N P G I S C D I F T R I M G K K A T K D G Q L C G F V D E R G L Y K S L K G A R L R L C G I S G L R L M D G S W V S L P Q V N N S E W
 EBLV2 G C S T N H D Y T I W M P E N P N P G V S C D I F T T K G K K A T K D G K L C G F V D E R G L Y K S L K G A K L K L C G I S G M R L M D G S W V S I Q N H D E A K W
 EBLV1 G C P T N H D Y T I W I P E N P K P G L S C D I F T T K G K K A T K D G R L C G F V D E R G L Y K S L K G A K O R L C G V P G M R L M D G S W V S L Q K T E A P E W
 IRKV G C S T N H D Y T L W L F E K E K L S M S I N F V S K G K K A T K D G R L C G F V D E R G L Y K S L K G A K L K L C G M A G M R L M D G S W V S L Q R A D A P E W
 KHUV G C S T N H D Y T I W M P E N T K T G M S C D I F T T K G K R A T K D G K L C G F V D E R G L Y K S L K G S K L K L C G V S G L R L M D G S W V S I Q N H E E A K W
 ARAV G C S T N H D Y T L W M P E N P K P G V S C D I F T T K G K K A T K D G K L C G F V D E R G L Y K S L K G A K L K L C G V M G L R L M D G S W V S L Q K T E E S E W
 WCBV G P T N H D F T I W M P E S E N I R S A I N F S T R G K L V R N R T S T G I I D E R G L F R S V K G A K I S I C R Q G I R L V D G T W M S F R Y S E Y L P V

MOKV G T P N Q L I N I I H N R D E I E H L I V E D I I K K R E E C L D T E T I L M S Q S V S F R R L S H F R K L V P G Y G K A Y T I L N G S L M E T N V Y Y K R V D K W A
 LBV G L P N Q L V N I I H N R D E V E H L I V E D I R K K R E E C L D T E T V L M S K S I S F R R L S H F R K L V P G Y G K A Y T I L N G S L M E T N V H Y L K V D N W S
 RABVC G P P D Q L V N L H D F R S D E I E H L V V E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S V S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I F N K T M E A D A H Y K S V R T W N
 DUVV G S P D Q L V N I H D F H S D E I E H L V A D E L V K K R E D C L D A L E T I L F T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N K T M E A E A H Y K S V R E W K
 EBLV2 G S P D Q L V N I H D F H S D E V E H L I A E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N K T M E A D A H Y K S I R E W T
 EBLV1 G S P D Q L V N V H D F H T D E I E H L V V E L V K K R E E C L D A L E T I I T T K S I S F R R L S H F R K L V P G F G K A Y T L I N K T M E A D A H Y K S V R E W K
 IRKV G P P G A L V N V H D F H S D E I A H F V V E L I K K R E E C L D T E T I L T T K S I S F R R L S H F R K L V P G L G K A Y T I N N T M E A E A H Y K S I R E W K
 KHUV G P P D Q L V N V H D F H S D E I E H L I V E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N K T M E A D A H Y K S I R E W S
 ARAV G S P N Q L I N I H D F H S D E I E H M V V E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T L I N K T M E A D A H Y K S V R E W T
 WCBV G S P S Q L I N T H D I K V D E L E N A I V L D I R R R E E C L D T E T I L M S G S V S F R R L S H F R K L V P G S G K A Y S Y I N G T M E S D A H Y I K V E N W S

MOKV G D I L P S K G C L K V G G Q C M E P V K G V L F N G I I K G P D G Q I L I P E M Q S L Q Q H M D L L K A A V F P L R H P L I S R E A V F K K D G D A D F V D L H M
 LBV G E I L P S K G C L K I N N Q C V A H Y K G V F F N G I I K G P D G H I L I P E M Q S L Q Q H M D L L K A A V F P L K H P L I E P G S L F N K D G D A D E F V D V H M
 RABVC G E I I P S K G C L K V G G R C H P H V N G V F F N G I I L G P D G H V L I P E M Q S L Q Q H M E L L K S S V I P L M H P L A D P S T V F K E G D E A E F V E V H L
 DUVV G E I I P S K G C L K A G G R C Y P H H N G I F F N G I I L G P G G E I L I P E M Q S A L Q Q H I E L L E S S V I P L K H P L A D P S T V F K E D A E S F V D V H L
 EBLV2 G D V I P S K G C L M A G G R C Y P H H N G V F F N G I I L S P D G H V L I P E M Q S A M Q Q H I E L L E S S V I P L M H P L A D P S T I F K K D D G A E D F V E V H L
 EBLV1 G E V I P S K G C L M A G G R C H P H Y S G I F F N G I I L S P G G D V L I P E M Q S A L Q Q H I E L L E S S M I P L R H P L A D P S T V F K R D D E A E D F V E V H L
 IRKV G E I I P S K G C L K A G G R C H P H Y D G I F F N G I I L G P N G D V L I P E M Q S S L Q Q H I E L L E S S M I P L R H P L A D S A I F R S D N E A E D F V D V H L
 KHUV G E I I P S K G C L V A G G R C Y H H H N G V F F N G I I L S P D G H V L I P E M Q S A L Q Q H I E L L E S S V I P L M H P L A D P S T V F K G D D G A E D F V E V H L
 ARAV G E V I P S K G C L K A G G C C Y P H Y N R V F F N G I I L S P D G H V L I P E M Q S A L Q Q H I E L L E S S V I P L R H P L A D P S T V F K G D D E A E E F V E V H L
 WCBV G E V I P H K G C L M V G G K C Y E P V N D V Y F F N G I I R D S N N Q I L I P E M Q S S L R E H V D L L K A N I V P F R H P M L R S F T S D T E D I V E W N P H L

MOKV G P D V H K S V I D V D L G L P H G F W M I G A T I V A F V V L V C L L R V C K R V R R R - - R S G R A T Q E I P L S F P S A P V P R A K V S S W E S Y K G L P
 LBV G P D V H K L V I D V D L G L P D S L Y A I I G A T I I A F F I L I C L I R I C K K G G R R - - N S P T N R P D L P I G L S T T P Q P K S K V I S W E S Y K G T S
 RABVC G P D V Y K Q I S G V D L G L P N G K Y V M T A G A M I G L V L I F S L M T W R R A N R P - - E S K Q R S F G G T R N V S V T S Q S G K V I P S W E S Y K S G G
 DUVV G P D T N Q I S G I D L G L P E K R Y F I G V S A V A L L A L S I I A V C K R F R R - - K S K P G P V E L T R K V S V I S K G N G P V P S W E S Y K E G T
 EBLV2 G P D V Q K Q I S G I D L G L P E W K R Y F I G V S A L A F L A L M I F I A A C R R V K R K - - K R A K P N P V E L I R K V S V T S Q S G R P I P S W E S Y K V E T
 EBLV1 G P D T Q K I S G I D L G L P E W K R Y F I G I S V L A L L A L I I A A C K R F K R R - - R R P K P N P I E L I R K V S V T S Q S G R A I P S W E S Y K V G A
 IRKV G P D T Q K Q V I D I D L G L P E W K R Y F I G V S A I A L F S L A I I I A V C R R F K R R - - K R P K P G I E L R K V S V T S Q S G K V P S W E S Y K E G A
 KHUV G P D V Q K Q I S G I D L G L P E W K R Y F I G V A A L T L F A L T I F V V C R R V R R R - - E R A K P N P V E L I R K V S V T S Q S G K V I P S W E S Y K V E A
 ARAV G P D T Q K Q I S G I D L G L P E W K R Y F M G M S A I G F L A L T I I L A V C R R I K R R - - Q S K P N P V E L I R K V S V T S Q S G R A I P S W E S Y K V K T
 WCBV G Q D T Q K L V I D M D L G L S D W K R Y L I G S L A V G G V A I L F I G T C L R C R A G R N R R T I R S N H R S L S H D V V F H K D K D K V I T S W E S Y K G Q T

510
 MOKV G GT - - - - -
 LBV G NV - - - - -
 RABVC G E I R L - - - - -
 DUVV G T G D V R N T T P S T R E
 EBLV2 G G G S - - - - -
 EBLV1 G T G E S - - - - -
 IRKV G T S Q P - - - - -
 KHUV G E G Q S Q A - - - - -
 ARAV G G D Q P Q V - - - - -
 WCBV G A Q - - - - -

594

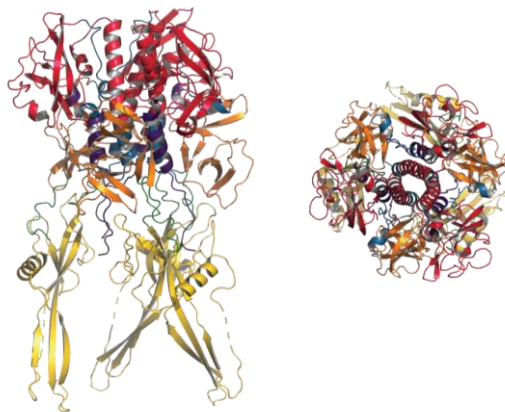
595 **S2 Figure:** Sequence alignment of lyssavirus glycoproteins.

596 Conserved residues are in red boxes whereas similar ones are in pink. Residues that are found
597 substituted in mutants escaping neutralization by MAbs are indicated by a square (in magenta
598 for antigenic site II, in brown for antigenic site III, in cyan for minor site a, in green for low pH
599 antigenic site). The location of 17D2 antigenic site is underlined in pink. Black stars indicate
600 acidic residues in the long helix. Purple stars indicate the other acidic residues or the histidines
601 that play the role of pH sensitive conformational switches (see text).

602

603

604



605

606 **S3 Figure:** Lateral and top views of the modelled MOKV G post-fusion trimer.

607 MOKV G post-fusion trimer was constructed by modelling the arrangement of the helices at
608 the trimeric interface. For this purpose, the helices were superimposed on a GCN4 coiled-coil.
609 In this post-fusion trimer model, there are no steric clashes between subunits. The fusion
610 domains slightly split apart, which may not be the case in the real post fusion trimer (due to
611 flexibility of R2 and R3 segments or of the fusion domain itself).

612

613

614

615 **Data collection**

616	Wavelength	1.648
617	Resolution range	45.22 - 2.893 (2.997 - 2.893)
618	Space group	C2221
619	Unit cell	a=76.279, b=81.951, c= 231.337
620	Total reflections	216607 (31149)
621	Unique reflections	15237 (885)
622	Completeness (%)	91.60 (54.07)
623	Mean I/sigma(I)	10.16 (0.95)
624	CC1/2	99.8 (79.8)

625

626 **Refinement statistics**

627	Reflections used in refinement	15234 (884)
628	Reflections used for R-free	783 (47)
629	R-work	0.2360 (0.3475)
630	R-free	0.2852 (0.4107)
631	Number of non-hydrogen atoms	3144
632	macromolecules	3124
633	ligands	20
634	Protein residues	394
635	RMS(bonds)	0.011
636	RMS(angles)	1.40
637	Ramachandran favored (%)	93.83
638	Ramachandran allowed (%)	5.14
639	Ramachandran outliers (%)	1.03
640	Rotamer outliers (%)	0.56
641	Clashscore	16.02
642	Average B-factor	76.86
643	macromolecules	76.55
644	ligands	125.24
645	PDB ID	6TMR

646

647

648 **Table 1:** Data collections and refinement statistics

649

650

<i>Domain</i>	<i>Residues</i>	<i>color</i>
TrD	1-17 and 273-373	Red
PHD	35-46 and 191-259	Orange
FD	55-180	Yellow
R1	18-34	Blue
R2	47-54	Green
R3	181-190	Green
R4	260-272	Blue
R5	374-401	Magenta

651

652 **Table 2:** Domains and segments nomenclature used in the text.

653

654

References

- 655
656
- 657 1. Rupprecht C, Kuzmin I, Meslin F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums,
658 concerns, contradictions and controversies. *F1000Res*. 2017;6:184.
 - 659 2. Belot L, Albertini A, Gaudin Y. Structural and cellular biology of rhabdovirus entry. *Adv*
660 *Virus Res*. 2019;104:147-83.
 - 661 3. Guo Y, Duan M, Wang X, Gao J, Guan Z, Zhang M. Early events in rabies virus infection-
662 Attachment, entry, and intracellular trafficking. *Virus research*. 2019;263:217-25.
 - 663 4. Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Crick J, Tignor GH. Is the acetylcholine receptor a
664 rabies virus receptor? *Science*. 1982;215(4529):182-4.
 - 665 5. Thoulouze MI, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. The neural
666 cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol*. 1998;72(9):7181-90.
 - 667 6. Tuffereau C, Benejean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A. Low-affinity nerve-growth
668 factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J*.
669 1998;17(24):7250-9.
 - 670 7. Wang J, Wang Z, Liu R, Shuai L, Wang X, Luo J, et al. Metabotropic glutamate receptor
671 subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus. *PLoS Pathog*. 2018;14(7):e1007189.
 - 672 8. Piccinotti S, Kirchhausen T, Whelan SP. Uptake of rabies virus into epithelial cells by
673 clathrin-mediated endocytosis depends upon actin. *J Virol*. 2013;87(21):11637-47.
 - 674 9. Piccinotti S, Whelan SP. Rabies Internalizes into Primary Peripheral Neurons via Clathrin
675 Coated Pits and Requires Fusion at the Cell Body. *PLoS Pathog*. 2016;12(7):e1005753.
 - 676 10. Gaudin Y, Ruigrok RW, Knossow M, Flamand A. Low-pH conformational changes of
677 rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol*. 1993;67(3):1365-72.
 - 678 11. Gaudin Y, Ruigrok RW, Tuffereau C, Knossow M, Flamand A. Rabies virus glycoprotein
679 is a trimer. *Virology*. 1992;187(2):627-32.
 - 680 12. Durrer P, Gaudin Y, Ruigrok RW, Graf R, Brunner J. Photolabeling identifies a putative
681 fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. *J*
682 *Biol Chem*. 1995;270(29):17575-81.
 - 683 13. Roche S, Gaudin Y. Characterization of the equilibrium between the native and fusion-
684 inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is
685 made of several trimers. *Virology*. 2002;297(1):128-35.
 - 686 14. Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flamand A, et al.
687 Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol*. 1991;65(8):4198-203.
 - 688 15. Flamand A, Raux H, Gaudin Y, Ruigrok RW. Mechanisms of rabies virus neutralization.
689 *Virology*. 1993;194(1):302-13.
 - 690 16. Lafon M, Wiktor TJ, Macfarlan RI. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein:
691 analysis with monoclonal antibodies. *J Gen Virol*. 1983;64(Pt 4):843-51.
 - 692 17. Raux H, Coulon P, Lafay F, Flamand A. Monoclonal antibodies which recognize the
693 acidic configuration of the rabies glycoprotein at the surface of the virion can be
694 neutralizing. *Virology*. 1995;210(2):400-8.
 - 695 18. Lafay F, Benmansour A, Chebli K, Flamand A. Immunodominant epitopes defined by a
696 yeast-expressed library of random fragments of the rabies virus glycoprotein map outside
697 major antigenic sites. *J Gen Virol*. 1996;77(Pt 2):339-46.
 - 698 19. Prehaud C, Coulon P, LaFay F, Thiers C, Flamand A. Antigenic site II of the rabies virus
699 glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J Virol*. 1988;62(1):1-7.

- 700 20. Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flamand A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and
701 sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the
702 glycoprotein. *J Virol.* 1985;53(3):926-34.
- 703 21. Tuffereau C, Leblois H, Benejean J, Coulon P, Lafay F, Flamand A. Arginine or lysine
704 in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult
705 mice. *Virology.* 1989;172(1):206-12.
- 706 22. Coulon P, Ternaux JP, Flamand A, Tuffereau C. An avirulent mutant of rabies virus is
707 unable to infect motoneurons in vivo and in vitro. *J Virol.* 1998;72(1):273-8.
- 708 23. Dietzschold B, Gore M, Marchadier D, Niu HS, Bunschoten HM, Otvos L, Jr., et al.
709 Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of
710 the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J Virol.*
711 1990;64(8):3804-9.
- 712 24. Roche S, Rey FA, Gaudin Y, Bressanelli S. Structure of the prefusion form of the
713 vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science.* 2007;315(5813):843-8.
- 714 25. Baquero E, Albertini AA, Raux H, Buonocore L, Rose JK, Bressanelli S, et al. Structure
715 of the low pH conformation of Chandipura virus G reveals important features in the
716 evolution of the vesiculovirus glycoprotein. *PLoS Pathog.* 2015;11(3):e1004756.
- 717 26. Roche S, Bressanelli S, Rey FA, Gaudin Y. Crystal structure of the low-pH form of the
718 vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science.* 2006;313(5784):187-91.
- 719 27. Baquero E, Albertini AA, Raux H, Abou-Hamdan A, Boeri-Erba E, Ouldali M, et al.
720 Structural intermediates in the fusion-associated transition of vesiculovirus glycoprotein.
721 *EMBO J.* 2017;36(5):679-92.
- 722 28. Libersou S, Albertini AA, Ouldali M, Maury V, Maheu C, Raux H, et al. Distinct
723 structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion. *J Cell Biol.*
724 2010;191(1):199-210.
- 725 29. Nikolic J, Belot L, Raux H, Legrand P, Gaudin Y, A AA. Structural basis for the
726 recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nat Commun.*
727 2018;9(1):1029.
- 728 30. Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its
729 family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings*
730 *of the National Academy of Sciences of the United States of America.*
731 2013;110(18):7306-11.
- 732 31. Gaudin Y. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with
733 endoplasmic reticulum chaperones. *J Virol.* 1997;71(5):3742-50.
- 734 32. Gaudin Y, Raux H, Flamand A, Ruigrok RW. Identification of amino acids controlling
735 the low-pH-induced conformational change of rabies virus glycoprotein. *J Virol.*
736 1996;70(11):7371-8.
- 737 33. Gaudin Y, Moreira S, Benejean J, Blondel D, Flamand A, Tuffereau C. Soluble
738 ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a
739 monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the
740 complete, membrane-anchored glycoprotein. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 7):1647-56.
- 741 34. Ferlin A, Raux H, Baquero E, Lepault J, Gaudin Y. Characterization of pH-sensitive
742 molecular switches that trigger the structural transition of vesicular stomatitis virus
743 glycoprotein from the postfusion state toward the prefusion state. *J Virol.*
744 2014;88(22):13396-409.
- 745 35. Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T. A switch between two-, three-, and four-stranded
746 coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science.* 1993;262(5138):1401-7.

- 747 36. Yin HS, Wen X, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. Structure of the parainfluenza
748 virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*. 2006;439(7072):38-
749 44.
- 750 37. Tuffereau C, Desmezieres E, Benejean J, Jallet C, Flamand A, Tordo N, et al. Interaction
751 of lyssaviruses with the low-affinity nerve-growth factor receptor p75NTR. *J Gen Virol*.
752 2001;82(Pt 12):2861-7.
- 753 38. Albertini AA, Merigoux C, Libersou S, Madiona K, Bressanelli S, Roche S, et al.
754 Characterization of monomeric intermediates during VSV glycoprotein structural
755 transition. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002556.
- 756 39. Vallbracht M, Brun D, Tassinari M, Vaney MC, Pehau-Arnaudet G, Guardado-Calvo P,
757 et al. Structure-Function Dissection of Pseudorabies Virus Glycoprotein B Fusion Loops.
758 *J Virol*. 2018;92(1).
- 759 40. Gibbons DL, Erk I, Reilly B, Navaza J, Kielian M, Rey FA, et al. Visualization of the
760 target-membrane-inserted fusion protein of Semliki Forest virus by combined electron
761 microscopy and crystallography. *Cell*. 2003;114(5):573-83.
- 762 41. Sanchez-San Martin C, Sosa H, Kielian M. A stable prefusion intermediate of the
763 alphavirus fusion protein reveals critical features of class II membrane fusion. *Cell Host*
764 *Microbe*. 2008;4(6):600-8.
- 765 42. Stiasny K, Bressanelli S, Lepault J, Rey FA, Heinz FX. Characterization of a membrane-
766 associated trimeric low-pH-induced Form of the class II viral fusion protein E from tick-
767 borne encephalitis virus and its crystallization. *J Virol*. 2004;78(6):3178-83.
- 768 43. Ginger M, Haberl M, Conzelmann KK, Schwarz MK, Frick A. Revealing the secrets of
769 neuronal circuits with recombinant rabies virus technology. *Frontiers in neural circuits*.
770 2013;7:2.
- 771 44. Haberl MG, Viana da Silva S, Guest JM, Ginger M, Ghanem A, Mülle C, et al. An
772 anterograde rabies virus vector for high-resolution large-scale reconstruction of 3D
773 neuron morphology. *Brain structure & function*. 2015;220(3):1369-79.
- 774 45. Engilberge S, Riobe F, Di Pietro S, Lassalle L, Coquelle N, Arnaud CA, et al.
775 Crystallophore: a versatile lanthanide complex for protein crystallography combining
776 nucleating effects, phasing properties, and luminescence. *Chem Sci*. 2017;8(9):5909-17.
- 777 46. Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, et al.
778 Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology*.
779 2001;286(2):263-75.
- 780 47. Tani H, Komoda Y, Matsuo E, Suzuki K, Hamamoto I, Yamashita T, et al. Replication-
781 competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope
782 proteins. *J Virol*. 2007;81(16):8601-12.
- 783 48. Backovic M, Krey T. Stable Drosophila Cell Lines: An Alternative Approach to
784 Exogenous Protein Expression. *Methods Mol Biol*. 2016;1350:349-58.
- 785 49. Kabsch W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66(Pt 2):125-32.
- 786 50. Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A*. 2008;64(Pt 1):112-22.
- 787 51. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser
788 crystallographic software. *J Appl Crystallogr*. 2007;40(Pt 4):658-74.
- 789 52. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of
790 the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*.
791 2011;67(Pt 4):235-42.
- 792 53. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta*
793 *Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66(Pt 4):486-501.

- 794 54. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov
795 M, et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine.
796 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2012;68(Pt 4):352-67.
797

Title : Structural and functional study of the Rhabdovirus glycoprotein.

Keywords : Rhabdovirus, glycoprotein, viral receptors, neutralizing antibody, crystallographic structures.

Abstract : Rhabdoviruses are single stranded RNA enveloped viruses. They own a unique glycoprotein G anchored on the viral membrane. G is involved in the early stages of the viral cycle. At first G binds a cellular receptor, leading to the virus endocytosis. Then G orchestrates the membrane fusion between the viral and endosomal membranes. Membrane fusion allows the release of the viral genome into the cytoplasm of the infected cell.

The low-density lipoprotein receptor (LDLR) is the main receptor of VSV. The ectodomain of the LDLR is composed of a large ligand binding domain constituted of cysteine-rich domains (CR1 to CR7). In order to understand the molecular basis of the interaction between G and its receptor, we performed binding test of G with all the CR domains of the LDLR. This revealed that only CR2 and CR3 domains could bind G. When CR2 and CR3 are present in the VSV inoculum, they protect the cells from VSV infection. We crystallized G in complex with each of these CR domains. The structures reveal that CR2 and CR3 binding sites on G are identical, and that the same residues on G are involved in the binding of the two CR domains. HAP-1 cells in which the gene encoding the LDLR has been invalidated are still susceptible to VSV infection. This confirms that VSV can use other receptors than the LDLR itself to enter the cells. However, mutation of G residues that are key in the interaction with the CR domains of the LDLR abolish the infectivity of VSV in mammalian and insect cells. This indicates that the only VSV receptors in these cells are members of the LDLR family and that VSV G has specifically evolved to interact with their CR domains.

Moreover, we have shown that G mutated for key residues involved in the interaction with CR domains are still able to induce fusion. This work shows that receptor recognition and G fusion activities can be decoupled. This paves the way to develop glycoproteins derived from G with modified tropism.

In Rhabdoviruses, G is the only target of neutralizing antibodies. There is no structure of a Rhabdovirus G in complex with an antibody. The 8G5F11 antibody neutralizes several genotypes of the genus Vesiculovirus including VSV. We have shown that FAB 8G5F11 prevents infection of cells by VSV Indiana on the one hand and that they recognize the pre- and post-fusion form of VSV G with a 1: 1 G: FAB stoichiometry on the other hand. We have developed the observation conditions of the G-FAB complex in cryo-electron microscopy, which could be useful to obtain the structure of the G-FAB complex.

We also started a study to characterize the glycoproteins of other Rhabdoviruses of the Lyssavirus genus. We produced and purified G ectodomains of rabies virus (RABV), Mokola virus (MOKV) and West Caucasian bat virus (WCBV). We characterize these G by electron microscopy at different pHs. The measurements made on G at pH 8 are compatible with those expected for a pre-fusion monomer of G. At pH 6, these ectodomains could correspond to a monomeric late intermediate in the structural transition. Obtaining the crystallographic structure of the G ectodomain of MOKV could validate these results.

Titre : Etude structurale et fonctionnelle de la glycoprotéine des Rhabdovirus.

Mots-clés : Rhabdovirus, glycoprotéine, récepteurs viraux, anticorps neutralisants, structures cristallographiques.

Résumé : Les Rhabdovirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité négative. Ils possèdent une unique protéine transmembranaire à leur surface, la glycoprotéine G. G est impliquée dans les étapes précoces du cycle viral. G lie dans un premier temps un récepteur cellulaire, menant à l'endocytose du virus. Ensuite, G orchestre la fusion membranaire entre les membranes virale et endosomale. Cette fusion membranaire permet la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule infectée.

Le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) est le récepteur principal du VSV. L'ectodomaine du LDLR est composé d'un grand site de liaison au ligand constitué de domaines riches en cystéines (CR1 à CR7). Afin de comprendre les bases moléculaires de l'interaction entre G et son récepteur, nous avons réalisé des tests de fixation de G aux différents domaines CR du LDLR. Cela a révélé que seuls les domaines CR2 et CR3 pouvaient lier G. Lorsque CR2 et CR3 sont incubés avec VSV dans l'inoculum, ils protègent les cellules de l'infection par VSV. Nous avons cristallisé G en complexe avec chacun de ces domaines CR. Les structures révèlent que le site de liaison de CR2 et de CR3 sur G sont identiques, et que les mêmes résidus sur G sont impliqués dans la liaison des deux domaines CR. Des cellules HAP-1 dans lesquelles le gène codant pour le LDLR a été invalidé, sont toujours sensibles à l'infection par VSV. Ceci confirme que VSV peut utiliser d'autres récepteurs que le LDLR pour entrer dans les cellules. Cependant la mutation des résidus de G qui sont clefs dans l'interaction avec les domaines CR du LDLR abolissent l'infectiosité de VSV aussi bien dans les cellules de mammifères que dans les cellules d'insectes. Ceci indique que les seuls récepteurs de VSV dans ces cellules sont des membres de la famille du LDLR et que VSV G a spécifiquement évolué pour interagir avec leur

domaines CR. Par ailleurs nous avons montré que les G dont les résidus clef pour l'interaction avec les domaines CR sont mutés, ont conservé leur activité de fusion. Ces travaux montrent que les activités de reconnaissance du récepteur et de fusion de G peuvent être découplées. Ceci ouvre la possibilité de développer des glycoprotéines dérivées de G au tropisme modifié.

Chez les Rhabdovirus, G est la seule cible des anticorps neutralisants. A ce jour il n'existe aucune structure de G de Rhabdovirus en complexe avec un anticorps. L'anticorps 8G5F11 neutralise plusieurs génotypes du genre Vésiculovirus dont VSV. Nous avons montré que les FAB 8G5F11 empêchent l'infection des cellules par VSV Indiana d'une part et qu'ils reconnaissent la forme pré- et post-fusion de VSV G avec une stœchiométrie G : FAB de 1 : 1 d'autre part. Nous avons mis au point les conditions d'observation du complexe G-FAB en cryo-microscopie électronique, ce qui permet d'envisager à terme une résolution de la structure du complexe G-FAB.

Enfin, nous avons débuté une étude visant à caractériser les glycoprotéines d'autres Rhabdovirus du genre Lyssavirus. Pour cela, nous avons produit et purifié les ectodomaines de G du virus de la rage (RABV), du virus Mokola (MOKV) et du virus de la chauve-souris ouest-caucasienne (WCBV). Ces G ont été caractérisées par microscopie électronique à différents pH. Les mesures effectuées sur G à pH 8 sont compatibles avec celles attendues pour un monomère de G pré-fusion. A pH 6, les ectodomaines observés pourraient correspondre à un intermédiaire monomérique allongé apparaissant tardivement lors de la transition structurale. Ces résultats pourraient être prochainement validés par l'obtention de la structure cristallographique de l'ectodomaine de G MOKV.