



HAL
open science

Rôle fonctionnel de protéines cellulaires interagissant avec la polymérase du virus de la rage

Clément Jousselin

► **To cite this version:**

Clément Jousselin. Rôle fonctionnel de protéines cellulaires interagissant avec la polymérase du virus de la rage. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS153 . tel-02950926

HAL Id: tel-02950926

<https://theses.hal.science/tel-02950926>

Submitted on 28 Sep 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.

Sorbonne Université

Complexité du vivant ED515

Unité Postulante des Stratégies Antivirales, Institut Pasteur

Rôle fonctionnel de protéines cellulaires interagissant avec la polymérase du virus de la rage

Par Clément Jouselin

Thèse de doctorat de Biologie Moléculaire et Cellulaire Option Microbiologie
Spécialité Virologie Moléculaire et Médicale

Dirigée par le Dr Noël Tordo

Présentée et soutenue publiquement le 8 Mars 2019

Devant un jury composé de :

Pr. Vincent Maréchal

Président

Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi

Rapporteur

Dr. Francesca Di Nunzio

Rapporteur

Dr. Danielle Bondel

Examineur

MC. Damien Brégeon

Examineur

Dr. Noël Tordo

Directeur de thèse

À ma famille

Remerciements

Je souhaiterais remercier, mon directeur de thèse, Dr Noël TORDO, directeur de l'Unité des Stratégies Antivirales de Pasteur, de m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse au sein de son unité, et de m'avoir accordé sa confiance dans l'accomplissement de ce travail. J'ai pu profiter de son expertise et d'une grande liberté dans les axes et les techniques que je voulais développer. S'il a su me faire partager justement ses connaissances et ses expériences, notamment au cours de ses nombreux voyages et nombreuses rencontres, il m'a également offert la possibilité de participer à certains congrès afin d'y présenter mon travail. Il a ainsi toujours eu le souci de faire évoluer ma pensée, mon analyse et mes réflexions scientifiques pour me conduire à toujours plus innover et persévérer.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, le Pr Pierre-Emmanuel CECCALDI et le Dr Francesca DI NUNZIO d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également le Pr Vincent MARECHAL, le Dr Danielle BLONDEL et le Dr Damien BERGEON pour leur engagement au sein de mon jury de thèse.

Je remercie le Dr Pierre CHARNEAU, responsable de l'unité de virologie moléculaire et vaccinologie, qui m'a offert l'opportunité de découvrir les vecteurs lentiviraux. Il m'a enseigné la multiplicité de leurs possibilités, leur potentiel, que j'ai eu l'occasion d'approfondir un peu plus lors de ma thèse. Cette technologie essentielle pour l'avenir de certaines recherches, a été essentielle pour le mien puisque je vais poursuivre ce travail au côté du Dr Nicolas LEVEQUE, à l'université de Poitiers.

Je remercie aussi l'unité de Neuro-immunologie Virale, Monique LAFON pour sa disponibilité, sa bienveillance et ses enseignements. J'ai eu la chance de participer et présenter mon travail lors des journées départementales de virologies qui sont, selon moi, indispensables à l'échange scientifique. Je tiens également à adresser mes remerciements à Christophe PREHAUD pour son écoute professionnelle et personnelle, et sa facilité à transformer une ambiance de travail en des moments d'échanges chaleureux et agréables.

Je remercie tous les membres du laboratoire dans lequel j'ai réalisé mon travail de thèse. Mohamed, ancien post-doctorant du laboratoire, qui a initié le projet hStaufen 1 et qui

m'a encadré lors de mon stage de Master 2. Corinne pour sa grande mémoire des projets réalisés dans l'unité, qui a su me soulager et me soutenir durant les différentes étapes de recherche. Kirill pour le partage de ses connaissances en biologie moléculaire et nos discussions anglophones sur la Russie. Myriam et Giulia pour les discussions scientifiques et avec lesquelles j'ai découvert Hambourg lors de mon premier congrès à l'étranger. Saliha pour son aide dans le développement des QPCRs. J'ai appris l'importance du travail d'équipe, des nombreux échanges, accords, désaccords, partages qui sont essentiels au travail de recherche.

Je souhaite profiter de cette page pour rendre hommage à Louis PASTEUR, qui a fondé, le 14 novembre 1888 son institut. Homme de génie et admirable scientifique, il est l'un des plus grands chercheurs de son temps et je suis honoré d'avoir été l'un de ses élèves chercheurs et d'avoir poursuivi son combat contre le virus de la rage.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger sur le travail d'étudiant en thèse, de nos projets, de nos convictions et surtout de notre passion pour la science, Jordane DIVOUX et Arthur COEIX, mes amis.

Pour conclure j'adresse chaleureusement mes remerciements à ma famille. Mes parents, qui m'ont transmis l'amour du travail, la persévérance et la passion. J'ai pu croire en ce rêve d'écrire ma thèse grâce à leur soutien. Mes beaux-parents, mes belles-sœurs Anaëlle et Salomé, et mes beaux-frères Maxence et Mathieu, qui avec leur singularité, leur bienveillance et leurs discussions animées, m'ont appris à croire davantage en ma passion, remettre en question mes certitudes et qui m'ont fait et me font découvrir toujours de nouveaux horizons. Mon épouse et mon fils, Adam, qui ont fait de ces trois années, les plus révélatrices, épanouissantes, passionnantes et intenses de ma vie.

« Cet univers ne serait pas grand-chose s'il n'abritait pas les gens qu'on aime. »

Stephen HAWKING

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	4
Abréviations	7
Introduction	10
I. La rage :	10
A. Historique de la rage	10
B. Epidémiologie de la rage	11
C. Prophylaxie antirabique et prévention	13
D. Physiopathologie du virus de la rage	14
E. Classification	16
F. Structure du virus de la rage	18
G. Organisation du génome rabique	20
H. Cycle viral rabique	21
1. Entrée du virus de la rage	22
a) Les récepteurs	22
b) Endocytose, fusion et libération des RNPs	24
2. Expression du génome viral	26
a) Transcription	26
b) Traduction	27
c) Réplication	28
3. Régulation de la synthèse des gènes viraux	29
4. Assemblage des particules et routage vers le site de bourgeonnement	30
I. Les protéines rabiques	32
1. La nucléoprotéine	32
2. La phosphoprotéine	33
a) La P et ses sous formes	34
b) La P et ses phosphorylations	36
c) La protéine P : interface entre virus et cellule infectée :	36
3. La protéine de Matrice	38
4. La glycoprotéine	41
5. L'ARN polymérase ARN dépendante	42
a) Structure de la L rabique	43
b) La pose de la coiffe :	44
c) Méthylation de la coiffe :	47
d) Polyadénylation	48
e) Partenaires des polymérases des Mononegavirales	49
II. Partenaires cellulaires de la polymérase L du virus de la rage	50
A. La protéine Staufén	51
1. dStaufén, clé du développement de la drosophile	52
2. La protéine Staufén chez les mammifères :	53
3. Organisation des gènes codant Staufén 1 et Staufén 2	55
4. Domaines de liaison à l'ARN	56
5. Séquences reconnues par Staufén et mécanisme d'interaction	56
6. Localisation subcellulaire de la protéine hStaufén 1	58
7. Staufén et le développement chez les mammifères	58
8. Staufén et le transport des ARNs	59
9. La protéine Staufén 1 et la régulation traductionnelle	60
10. La protéine Staufén 1 et la dégradation	61
11. La protéine Staufén et le stress cellulaire	63

12. La protéine Staufen 1 et les virus	65
a) Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)	65
b) Le virus Influenza	66
Objectif du travail de thèse	68
Matériels et méthodes	70
I. Analyse du crible en double hybride et recherche bibliographique :.....	70
II. Biologie moléculaire	72
A. Souches bactériennes et milieu de culture bactérien	72
B. Oligonucléotides	72
1. Small Interfering RNA (siRNA)	72
2. Clonage.....	73
C. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	73
D. Purification des produits PCR.....	74
E. Assemblage des fragments dans les plasmides et transformation bactérienne.....	74
F. Double hybride en levure	76
G. Production des vecteurs lentiviraux	77
1. Design des shRNAs et clonage.....	77
2. Production des vecteurs lentiviraux.....	79
3. Titrage des vecteurs lentiviraux.....	81
H. RT-qPCR.....	82
I. Miniréplicon	83
III. Biologie cellulaire.....	84
A. Souches cellulaires.....	84
B. Souches virales	85
C. Transfection des cellules.....	85
D. Transduction des cellules	85
E. Infection des cellules	86
F. Préparation d'extraits cellulaires totaux	86
G. Electrophorèse et Western Blot	86
H. Préparation des extraits d'ARN.....	87
1. ARNs viraux des surnageants cellulaires.....	87
2. ARN viraux cellulaire	88
I. Anticorps utilisés	88
J. Production virale et purification sur gradient de saccharose.....	89
1. Clarification.....	89
2. Concentration.....	89
3. Purification.....	90
K. Purification MAPs et tubuline.....	90
IV. Microscopie.....	91
Résultats	92
I. Etude de l'interaction de la protéine hStaufen 1 et de la polymérase rabique	92
A. Cartographie de l'interaction entre la protéine hStaufen 1 et la polymérase rabique par la méthode du double hybride en levure.....	92
B. Interaction de la protéine hStaufen 1 et de la polymérase rabique en cellules vivantes.....	94
II. Etude fonctionnelle de l'interaction entre la protéine hStaufen 1 et la polymérase rabique.....	95
A. Réorganisation de la protéine hStaufen 1 lors de l'infection rabique.....	95
B. La protéine hStaufen 1 gravite autour des corps de Negri	98

C. Diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 par shRNA porté par un vecteur lentiviral	99
1. Caractérisation des vecteurs.....	100
2. Effet de la diminution d'expression de hStaufen 1 sur l'infection rabique.....	104
3. Effet de la diminution d'expression de hStaufen 1 sur l'expression des RNPs intracellulaires.....	105
4. La protéine hStaufen 1 intervient dans le développement des corps de Negri secondaires.....	107
5. La protéine hStaufen 1 et l'activité de la polymérase rabique.....	109
6. La protéine hStaufen 1 et la production des particules virales.....	111
III. Détournement de la protéine hStaufen 1 par le virus rabique	114
A. La protéine hStaufen 1 est encapsidée dans la particule virale rabique.....	114
B. La protéine hStaufen 1 est présente dans les granules de stress viraux induits.....	116
C. La protéine hStaufen 1 et le transport intracellulaire des RNPs néosynthétisés.....	121
1. La protéine hStaufen 1 est elle une protéine associée aux microtubules (MAPs) ?.....	121
2. La protéine hStaufen 1 est condensée autour des RNPs néosynthétisées dans les prolongements neurales.....	124
Discussion et Perspectives	128
Travaux complémentaires	137
I. Les Protéine eEF1A1, hnRNPH2 et TGFβ111	137
A. Validation de l'interaction par la méthode du Double Hybride :.....	139
B. Etude des interactions par imagerie cellulaire.....	141
C. Effet de la diminution d'expression des partenaires de la polymérase rabique sur l'infection.....	144
D. Effet de la diminution d'expression des partenaires sur l'activité de la polymérase rabique.....	147
E. Effet de la diminution d'expression des partenaires sur le relargage de virion rabique dans le surnageant.....	148
F. Discussion.....	150
Bibliographie	153
Table illustration	167
Table tableau	170

Abréviations

3-AT : 3-Amino-1,2,4-triazole
3'UTR : régions non traduites en 3' (*three prime untranslated regions*)
5'UTR : régions non traduites en 5' (*five prime untranslated regions*)
ADNc : ADN complémentaire
ARF1 : ADP-ribosylation factor 1
ARNm : ARN messenger
ATP : Adénosine Triphosphate
ATRA : Acide Tout-Trans-rétinoïque
BET : Bromure d'éthidium
BSA : Albumine de sérum bovin (*Bovine SerumAlbumine*)
CaCl₂ : Chlorure de Calcium
CN : Corps de Negri
cPPT : Région centrale de Polypurine (*centra lPolypurine Tract*)
CRM1 : Chromosomal Maintenance 1 or Exportin 1
CTD : C-terminal Domain
Cter : C-terminale
CTS : Séquence de terminaison centrale (*Central Terminaison Sequence*)
CVS : souche virale rabique de challenge (*Challenge Virus Standard*)
D-D : *Dimerization Domain*
DLC : *Dyneine Light Chain Association*
DMEM : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
DRBM : Domaine de liaison à l'ARN (*Domain RNA Binding Motif*)
dsRBD : Domaine de liaison aux ARNs double brin (*double strand RNA Binding Domain*)
dStaufen : protéine Staufen chez la drosophile
DTT : Dithiothreitol
eIF3 : *Eukaryotic initiation factor 3*
Elisa : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (*Enzyme linked immunosorbent assay*)
ESCRT : *endosomal sorting complexes required for transport*
FACS : *Fluorescent Activated Cell Sorting*
FAK : *Focal Adhesion Kinase*
FISH : *Fluorescent In Situ Hybridation*
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine (*fluorescein isothiocyanate*)
G : Glycoprotéine
G3BP : Ras-GAP SH3 binding protein
GARC : Alliance mondiale contre la rage (*Global Alliance for Rabies Control*)
GDP : guanosine-diphosphate
GE : Gene End
GFP : Protéine Fluorescente Verte (*Green Fluorescent Protein*)
GMP : guanosine-monophosphate
GS : gene start
GS : Granules de stress
GTP : guanosine triphosphate
GTPase : GTP-phosphatase
hCMV : Promoteur du Cytomégalovirus Humain
HEK293T : Cellule embryonnaire de rein humain (*Human embryonic kidney cells*)
HRSV : Virus respiratoire syncytial humain (*Human Respiratory Syncytial Virus*)
hStaufen : protéine Staufen chez l'Homme
IRES : Site d'entrée interne des ribosomes (*Internal Ribosome Entry Site*)

ISG : *Interferon Stimulating Gene*
Kb : Kilobase
L : Large, polymérase
L domain : *Late Budding Domain*
LAK : Kinase potentiellement associée à la polymérase
LB : *Luria Growth*
LC8 : *dynein light chain*
LTR : Longue séquence terminale répétée (*Long Terminal Repeat*)
M : Matrice
MDA5 : *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*
MLV : leucémie murine Moloney
MOI : Multiplicité d'Infection (*Multiplicity of infection*)
mStaufen : protéine Staufen chez la souris
MTase : activité méthyltransférase
N : Nucléoprotéine
N-ARN : Nucléocapside
nAchR : récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NaCl : Chlorure de Sodium
NC : Nucléocapside
NCAM : *Neural cell adhesion molecule*
NES : Nuclear Export Signal
NLS : Signal de localisation nucléaire (*Nuclear Localisation Signal*)
NMD : *Nonsense-mediated mRNA decay*
NS1 : *Non Structural 1 protein*
Nter : N-terminale
OIE : Organisation mondiale de la santé animale anciennement Office Internationales des Epizooties
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPD : Ortho-Phénylène Diamine
P : Phosphoprotéine
P-Bodies : *Processing Bodies*
p75^{NTR} : récepteur basse affinité du NGF
PBS : Tampon Phosphate Salin (*Phosphate buffered saline*)
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase (*Polymerase Chain Reaction*)
PFA : Paraformaldéhyde
Pi : Post infection
PKC : Protéine Kinase c
PML : Pro-Myelocytic Leukemia
PolyA : Poly Adénylation
PRNTase : Activité polyribonucléotidyltransférase
PV : souche virale rabique Pasteur (*Pasteur strain virus*)
RBD : RNA Binding Domain
RBP : RNA Binding Protein
RdRp : ARN polymérase ARN Dépendante
RNP : Ribonucléoprotéine
RPL40 : Ubiquitin-60S ribosomal protein L40
RSV : virus respiratoire syncytial ou Respiratory Syncytial Virus
RT-PCR : Transcription Inverse-Réaction en Chaîne par Polymérase (*Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction*)
RVPK : *Rabies Virus Protein Kinase*

SAD : souche virale rabique (*Street Alabama Dufferin*)
SBS : Site de liaison Staufen (*Staufen Binding Site*)
SDS : Dodecylsulfate de sodium (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
shARN: Petit ARN en épingle à cheveux (*Small Hairpin RNA*)
siARN: Petit ARN interférent (*Small Interfering RNA*)
SMD : Staufen 1 mediated mARN decay
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
STAT-1 : *Signal Transducteur and Activation of Transcription 1*
Stau1 : Staufen 1
SVF : Sérum de veau
TAR : région de trans-activation (*Trans-activation responsive*)
tARN: ARN de transfert
TBD : Domaine de liaison à la tubuline (*Tubulin Binding Domain*)
TGS : Tampon Tris-Glycine-SDS
TIA-1 : T-cell intracellular antigen-1
TIAR : TIA-1 related protein
TIS : signal d'initiation transcriptionnelle (*Transcription Initiation Signal*)
TLR : Toll-like receptor
TRAIL : ligand inducteur d'apoptose lié a facteur de nécrose tumorale (*Tnf-related apoptosis inducing ligand*)
TTP : signal de terminaison transcritptionnelle et de polyadénylation (*Transcription Termination and Polyadenylation signal*)
TU : Unité de transduction (*Transducing Unit*)
UFF : Unité Formant Foyer
USA : Unité Stratégie Antivirale
VHB : Virus de l'Hépatite B
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine (*Human Immunodeficiency Virus*)
VLP : *Virus-like particles*
VSV : Virus de le Stomatite Vésiculaire
VSV-G : Glycoprotéine du Virus de la Stomatite Vésiculeuse
VSV : Virus de la Stomatite Vesiculaire
XRN1 : 5'-3' exoribonuclease 1

I. La rage :

A. Historique de la rage

La rage est une maladie connue depuis le XXIIIème siècle avant JC décrite dans le code d'Eshunna rédigé en Mésopotamie. La fatalité de la rage et sa transmission par le chien y sont mentionnées. Le chien est le principal vecteur de la maladie et en devient très vite le symbole dans l'antiquité gréco-romaine. En effet, la rage est associée à Sirius, la constellation du chien. Ce n'est qu'au Ier siècle avant JC que Cornelius CELSUS introduit l'hydrophobie comme premier symptôme de la rage.

Face à la sévérité et la flambée de la maladie, de nombreux traitements voient le jour. La cautérisation des plaies, les bains de mer froide ou d'huile chaude sont notamment adoptés pour tenter de lutter contre la maladie après la morsure. Seule la cautérisation s'avère efficace et subsiste jusqu'au temps de Louis Pasteur. Pour traiter l'hydrophobie et surtout la déshydratation qui en résulte, des « globules » de miel enfermant de l'eau sont utilisés (Rotivel, Goudal et al. 2002).

Longtemps mise de côté, ce n'est qu'au début du XIXème siècle, lors d'une grave épidémie de rage en Angleterre, que la communauté scientifique reprend de l'intérêt pour celle-ci. Parmi ces nombreux scientifiques, il y eût Georg Gottfried ZINKE qui, en 1804, décrit la transmission par la salive de l'agent responsable de la rage d'un animal contaminé vers un animal sain. Puis en 1879, Pierre-Victor GALTIER qui initie l'immunisation de la rage sur des moutons et développe un modèle lapin qui contribuera largement aux travaux de Louis Pasteur et de ses collaborateurs : Emile ROUX, Charles CHAMBERLAND et Louis THUILLIER. Suite au procédé de dessiccation de moelle contaminée mis au point par E. ROUX, le Docteur Jacques-Joseph GRANCHER, assisté par le Docteur Alfred VULPIAN et Louis PASTEUR, inocule le premier vaccin post-exposition à Joseph MEISTER en juillet 1885. Cette première vaccination ouvrira la voie à quelques sept-cent-vingt-six inoculations post-exposition. Très vite, les idées d'une vaccination préventive et de création d'établissements vaccinaux contre la rage apparaissent. Le premier Institut Pasteur est inauguré à Paris en novembre 1888. Par la suite, de nombreux autres Instituts Pasteur voient le jour à travers le monde dont le rôle ne se limitera pas seulement à la vaccination

antirabique. Aujourd'hui, les trente-deux Instituts Pasteur présents dans vingt-cinq pays jouent un rôle clé en santé publique. Cela est d'ailleurs confirmé par l'ouverture du dernier d'entre eux en Guinée, suite à l'épidémie récente à virus Ebola qui a déferlé pour la première fois sur l'Afrique de l'Ouest.

B. Épidémiologie de la rage

La rage est une zoonose virale à déclaration obligatoire transmise par la salive d'animaux enrégés et presque toujours mortelle. Bien qu'elle puisse être prévenue par une prophylaxie pré- et post-exposition, elle continue de tuer environ 60 000 personnes chaque année, principalement en Afrique et en Asie. Malgré l'importance du nombre de cas, il semble sous-estimé en raison du manque de déclarations ou d'accès à des centres antirabiques dans ces pays (Hampson, Coudeville et al. 2015, Taylor, Knopf et al. 2015, Taylor, Hampson et al. 2017).

La rage est endémique sur tous les continents, sauf l'Antarctique, et peut infecter des mammifères domestiques et sauvages. Parmi ceux-ci figure le chien qui constitue le principal vecteur du virus et cause, après morsure, 99% des cas de rage humaine, majoritairement des enfants de 5 à 14 ans. Une transmission interhumaine est théoriquement possible mais rarement observée, notamment lors de greffes de tissus de donneurs enrégés non diagnostiqués.

On distingue deux rages : celle dite « rage des rues » qui se réfère aux animaux domestiques enrégés, surtout le chien, et celle dite « rage sylvatique » qui désigne la faune sauvage. Une autre distinction est faite entre la « rage terrestre » véhiculée par des mammifères non volants dont, outre le chien, les principaux vecteurs carnivores sauvages (renard, raton-laveur, coyote, putois,...) et la « rage aérienne », transmise par les chiroptères. Certaines chauves-souris semblent survivre suite à une infection rabique, ce qui suggère qu'elles sont un réservoir très ancien du virus dont la longue coexistence avec l'agent aurait pu conduire à l'atténuation de la pathogénicité pour l'espèce, particulièrement en terme de population. Les chauves-souris constituent une menace émergente en Amérique, Australie et Europe de l'Ouest après le contrôle de la transmission par les chiens.

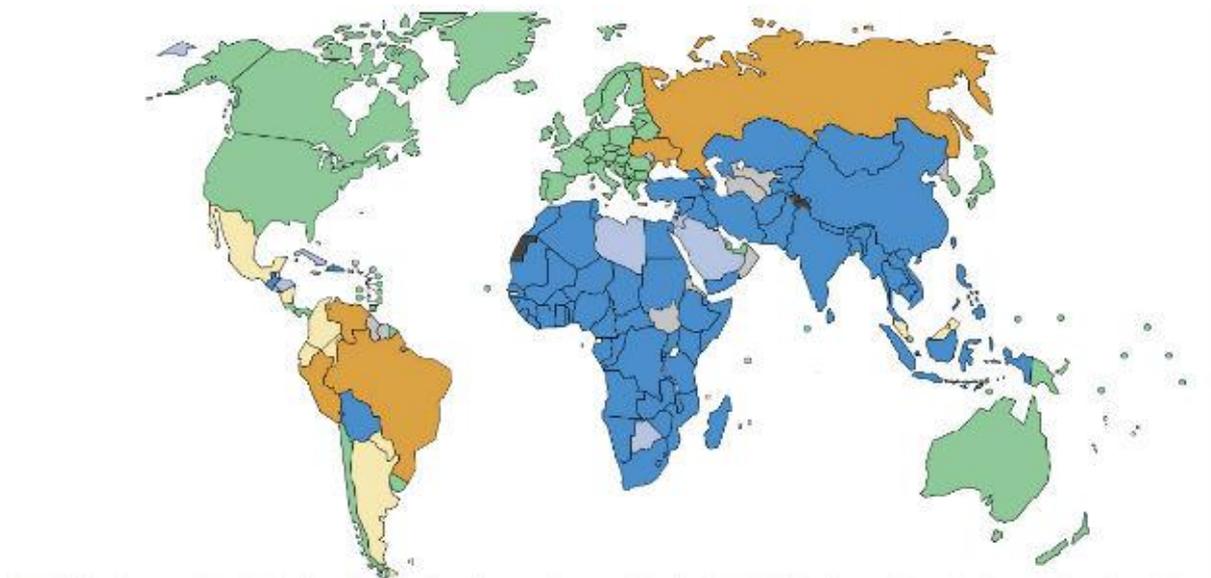


Figure 1 : Planisphère de la répartition géographique des cas de rage humains

Bleu : Endémie de la rage humaine transmise par les chiens : la rage canine et la rage humaine à transmission canine sont présentes dans le pays

Violet : Endémie de la rage canine : rage canine présente dans la majeure partie du pays, mais aucun cas de rage humaine transmise par les chiens

Marron : Cas sporadiques de rage transmise par les chiens : rage canine présente dans quelques zones du pays, accompagnée de cas humains sporadiques

Jaune : Maîtrise de la rage canine : quelques cas de rage canine dans des zones limitées du pays, mais aucun cas de rage humaine transmise par les chiens

Vert : Absence de rage canine : aucun cas de rage canine et aucun cas de rage humaine transmise par les chiens (sauf cas importés)

Gris : Aucune information

Noir : Sans objet

(Source : Organisation Mondiale de la Santé 2016)

Aujourd'hui, la répartition mondiale de la rage concerne très majoritairement les pays en développement, où l'on compte 80% des cas humains, notamment dans les régions rurales. En effet, ces zones ne bénéficient pas d'un accès aux traitements prophylactiques post-exposition ni à un contrôle efficace de la rage animale.

Dans les pays industrialisés, la rage reste sous contrôle, grâce à des campagnes de vaccination des animaux domestiques et sauvages, afin de briser la chaîne de transmission. Ainsi, la France est considérée comme indemne de rage terrestre depuis avril 2001, mais le virus persiste malgré tout chez certaines chauves-souris. Cependant, quelques cas ont pu être rapportés suite à l'importation clandestine d'animaux infectés ou à une contamination lors d'un séjour dans un pays non indemne. C'est ainsi qu'en mai 2015 la contamination d'un chien dans un pays non indemne de rage a conduit au traitement de vingt-deux personnes sur le territoire français. Plus récemment, en 2017 à Lyon, un jeune garçon est mort à la suite

d'une morsure par un chien enragé lors d'un séjour au Sri Lanka. Le dernier cas de rage autochtone en France métropolitaine est survenu en 1924.

Durant l'année 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) et l'Alliance Mondiale contre la Rage (GARC) ont signé un document ayant pour objectif de réduire à zéro le nombre de cas humains causés par la transmission canine à l'horizon 2030 (<http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/rabies>).

C. Prophylaxie antirabique et prévention

Le vaccin contre le virus de la rage fut l'un des premiers à être mis au point, par Louis Pasteur en 1884, sur le chien, et en 1885, sur l'Homme. Encore aujourd'hui, mais avec de nombreuses optimisations, ce vaccin est le premier moyen de lutte contre cette maladie. Il a permis le contrôle de la propagation du virus et la forte réduction de la mortalité. A partir des années 1970, une large campagne de vaccination de la faune sauvage a été réalisée en Europe de l'Ouest, par essaimage de vaccins oraux dans des appâts (Blancou, Pastoret et al. 1988). Accompagnée de la vaccination parentérale systématiques des animaux domestiques, ces campagnes ont permis l'élimination de la rage « terrestre » depuis l'Europe de l'Ouest vers l'Europe Centrale et plusieurs pays ont été progressivement déclarés « indemnes de rage », même si certains variants de virus circulent toujours chez les chauves-souris. Le contrôle de la rage canine est le moyen le plus efficace pour réduire la transmission à l'Homme, assumant qu'une couverture vaccinale de 70% soit atteinte, ce qui n'est pas toujours facile dans les pays en développement où les chiens sont peu accessibles (Hampson, Dushoff et al. 2009).

La vaccination post-exposition est encore largement utilisée de nos jours, avec quinze millions de personnes vaccinées chaque année. Des recommandations de l'OMS sont disponibles suite à une morsure suspecte. Il convient de nettoyer la plaie avec de l'eau et du savon ou toutes autres substances pouvant tuer le virus. Par la suite, une consultation chez un médecin permet d'établir la prophylaxie post-exposition la plus adaptée, à savoir, un schéma vaccinal précis qui doit être complété par une injection d'immunoglobulines antirabiques à l'endroit de la morsure dans le cas où une effraction de la peau est constatée. Il y a cependant un décalage net entre les recommandations de l'OMS et ce qui peut être mis en place sur le terrain, le monde souffrant d'un manque constant d'immunoglobulines. C'est pourquoi, il est

recommandé aux personnes à risque de pratiquer la vaccination pré exposition qui offre, elle, une protection à 100% contre la maladie.

D. Physiopathologie du virus de la rage

Le virus de la rage se transmet principalement après morsure puisqu'il se trouve dans la salive. La transmission peut également se faire lors de griffures, coupure avec des objets souillés, léchage de plaies et de muqueuses ou plus exceptionnellement lors de greffes d'organes qui sont la seule voie de transmission interhumaine connue (Bronnert, Wilde et al. 2007). La contamination par aérosol reste exceptionnelle mais a été répertoriée dans des grottes occupées par des chauves-souris contaminées et également lors d'accidents de laboratoires dans lesquels le virus est manipulé à forte concentration (Gibbons 2002). La durée d'incubation de la rage, autrement dit la phase asymptomatique, est d'un à trois mois mais peut s'étendre à un an en fonction du lieu d'inoculation et de la charge virale (Singh, Singh et al. 2017).

Suite à l'infection, le virus procède à une lente réplication au sein du tissu musculaire (Murphy and Bauer 1974) pour ensuite passer dans le système nerveux via les jonctions neuromusculaires. Cette étape plus ou moins longue rend possible plus rapidement la prophylaxie post-exposition après la morsure. Après avoir accédé au système nerveux périphérique, le virus est transporté jusqu'au corps cellulaire, dans le sens rétrograde, à une vitesse de 3mm/h (Gluska, Zahavi et al. 2014). Ce routage intracellulaire est microtubule dépendant.

Dans le système nerveux périphérique, le virus présente, là encore, une faible multiplication accompagnée d'un bourgeonnement exclusivement au niveau des terminaisons nerveuses par voie trans-synaptique. Cette première dispersion du virus conduit à plusieurs symptômes initiaux, parmi lesquels une fièvre accompagnée de douleurs ou de fourmillements, des démangeaisons ou des sensations de brûlures (paresthésie) au lieu d'inoculation. Lors de l'atteinte du système nerveux central (SNC), le virus se multiplie et se propage dans diverses régions neuronales et dans le système nerveux périphérique puis autonome, pour atteindre les glandes salivaires permettant la transmission à un nouvel individu.

La dispersion du virus dans le SNC conduit progressivement à l'inflammation de l'encéphale et de la moelle épinière. Cela peut entraîner deux formes de rage : (1) la forme

dite « furieuse », où le malade présente une hyperactivité associée à une excitabilité, une hydrophobie et parfois une aérophobie. La mort s'en suit par arrêt cardiorespiratoire. (2) La forme dite « paralytique », qui représente 30% des cas humains bien que ce pourcentage soit probablement sous-estimé en raison de la faible spécificité des symptômes. En effet ceux-ci sont moins spectaculaires et plus long à observer. Progressivement les muscles se paralysent, à partir du site d'inoculation, pour aboutir au coma et à la mort du patient. Dès l'apparition des premiers symptômes, la mort est inévitable. Ces symptômes, et l'issue fatale de cette maladie, en font une maladie violente tant sur le plan physique que psychologique, ce qui lui a d'ailleurs valu le nom de rage, qui vient du latin *rabies*, qui signifie *faire violence* et du grec, *lyssa*, qui signifie *violent*.

La sévérité de la pathogénèse rabique ne peut seulement s'expliquer par les lésions, l'apoptose cellulaire et le dysfonctionnement neuronal induits par le virus de la rage. Le dysfonctionnement viral-induit des cellules neuronales infectées module le niveau d'expression de gènes (Fu, Weihe et al. 1993) et perturbe la neurotransmission acétylcholine et sérotonine dépendante (Tsiang 1982, Ceccaldi, Fillion et al. 1993). De plus, l'inflammation causée par le virus, pour l'éliminer, participe aussi au dysfonctionnement du SNC.

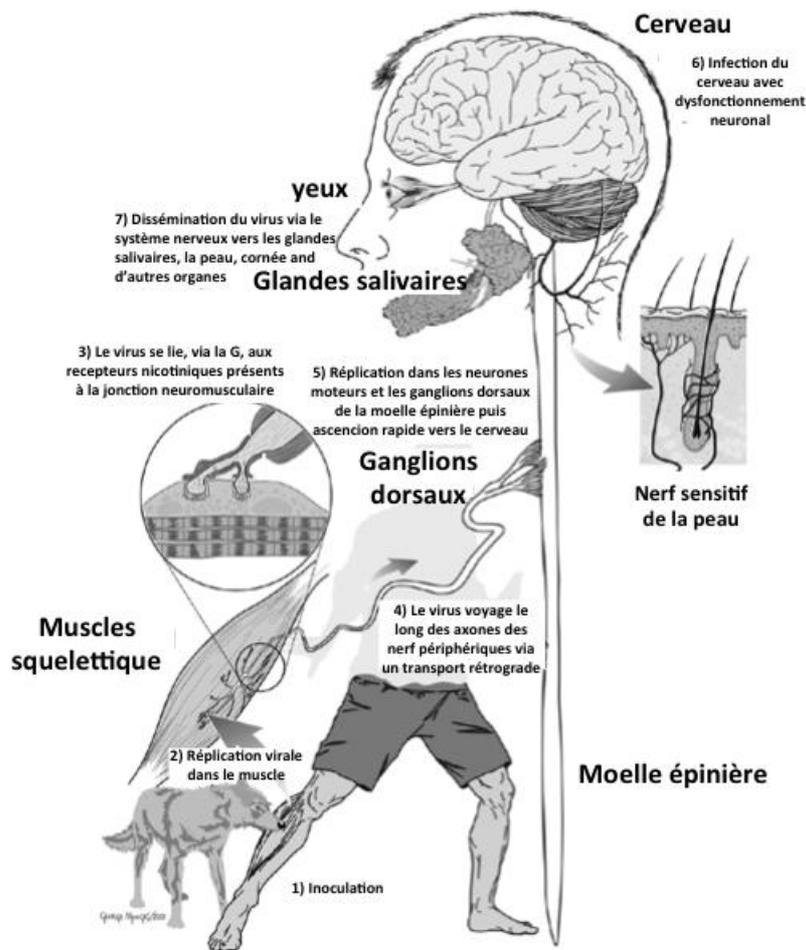


Figure 2 : Schéma explicatif d'une infection rabique et de la propagation du virus dans l'organisme

(1) Le virus de la rage se transmet via la salive d'animaux enrégés (la morsure de chiens cause 99% des cas humains). (2) Le virus se réplique au site d'inoculation dans les cellules musculaires, (3) puis accède au système nerveux via les jonctions neuromusculaires où la glycoprotéine se lie à des récepteurs spécifiques. (4 et 5) Le virus détourne le transport cellulaire (rétrograde et antérograde) pour (6) accéder au système nerveux central où il s'y réplique et entraîne apoptose et dysfonctionnements neuronaux. (7) Enfin, le virus se dissémine du système nerveux vers plusieurs organes dont les glandes salivaires pour infecter un nouvel hôte. Aucune transmission interhumaine par morsure n'a été documentée. (Jackson 2014)

E. Classification

L'ordre des *Mononegavirales*, en constante évolution, se compose actuellement de onze familles virales : les *Artoviridae*, les *Bornaviridae*, les *Filoviridae*, les *Lispiviridae*, les *Myonaviridae*, les *Nyamaviridae*, les *Paramyxoviridae*, les *Pneumoviridae*, les *Sunviridae*, les *Xinmoviridae* et les *Rhabdoviridae*. Elles ont pour caractéristique d'avoir comme génome

une unique molécule d'ARN simple brin de polarité négative, pouvant aller de 8000 à 20000 nucléotides qui codent 5 à 12 gènes. La famille des *Rhabdoviridae* regroupe 18 genres plus une espèce non classée, parmi lesquels les *Lyssavirus* qui provoquent la rage et les *Vesiculovirus*, notamment le virus de Stomatite Vésiculaire (VSV). Ce dernier est le prototype des *Rhabdoviridae* et a même souvent servi de modèle d'étude pour l'ensemble des *Mononegavirales* de par l'homologie structurale et fonctionnelle existant entre leurs protéines.

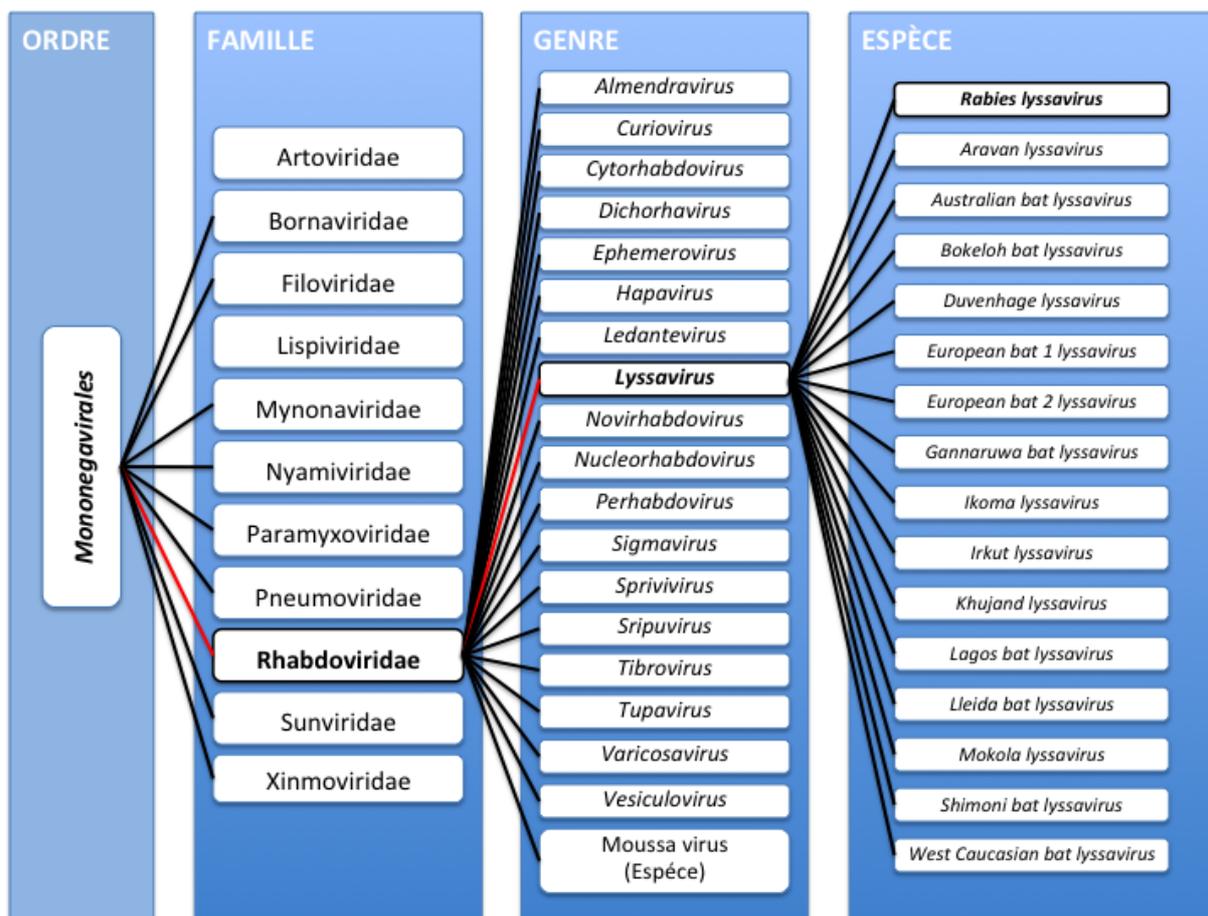


Figure 3 : Schéma de la classification des *Mononegavirales* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) (Amarasinghe, Arechiga Ceballos et al. 2018)

Le genre des *Lyssavirus* comprend seize espèces. L'espèce « *rabies lyssavirus* » regroupe les virus responsables de la majorité des cas humains ainsi que les souches de laboratoire : Pasteur Virus (PV), Street Alabama Dufferin (SAD), Challenge Virus Standard (CVS), Pitman-Moore (PM), Evelyn Rokitniki Abelseth (ERA), Flury-LEP (Low Egg Passage) et -HEP (High Egg Passage). Seules les espèces « Mokola » et « Ikoma » n'ont pas

été retrouvées chez les Chiroptères ce qui n'interdit pas qu'elles en soient issues. En effet, la présence des quatorze autres espèces chez les Chiroptères renforce l'idée qu'elles constituent le réservoir initial du virus. De plus, l'augmentation de transmission du virus par les chauves-souris, associée à cette large diversité des *Lyssavirus* qu'elles abritent, pose de réelles questions d'émergence de nouveaux variants non couverts par la souche vaccinale. (Souche Wistar Pitman Moore L503 3M).

F. Structure du virus de la rage

Le virus de la rage possède une morphologie caractéristique dite en « balle de fusil », commune à tous les *Rhabdoviridae*, à l'exception des virus des plantes qui sont plutôt bacilliformes. Les virions ont un diamètre de 60 à 80 nm et une longueur de 130 à 300 nm, dépendant de la souche virale et de la formation de particules défectives (Matsumoto 1962, Tordo, Poch et al. 1988).

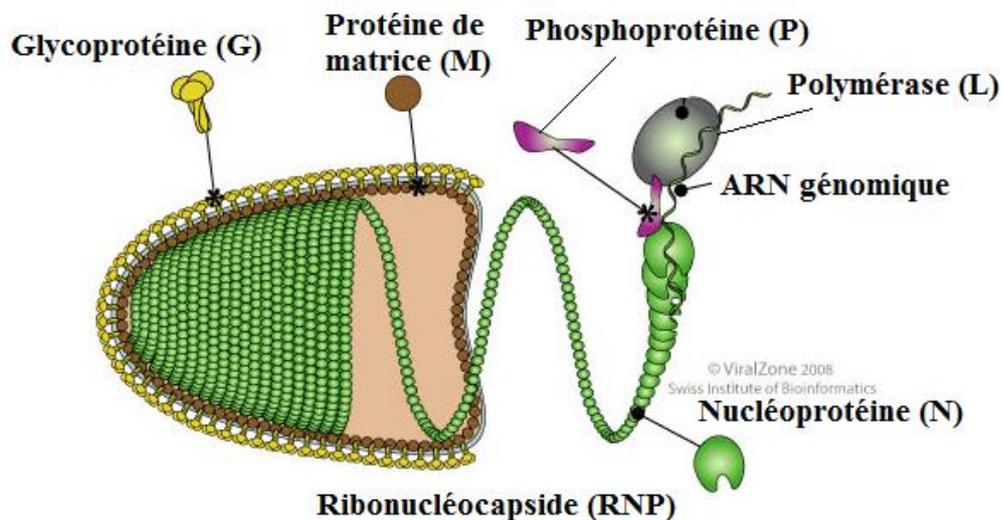


Figure 4 : Schéma d'une particule virale rabique

La particule virale rabique se compose d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire, sur laquelle est présente la glycoprotéine G. La protéine M, en position sous-membranaire, confère la forme caractéristique dite en « balle de fusil » au virus de la rage et permet l'encapsidation de la ribonucléocapside (RNP). La RNP est composée de l'ARN génomique encapsulée par la nucléoprotéine N, la polymérase L et son cofacteur, la phosphoprotéine P. (Source : Viralzone)

La particule virale est enveloppée d'une bicouche lipidique, d'origine cellulaire, qu'il obtient lors de son bourgeonnement, dans laquelle sont insérées des spicules de glycoprotéines G (trimère transmembranaire), d'une longueur de 5 à 10 nm (Gaudin, Ruigrok et al. 1992). La face interne de la particule est, quant à elle, tapissée de la protéine de matrice (M), qui participe à la forme caractéristique du virus (Newcomb and Brown 1981) et à l'encapsidation/assemblage de la ribonucléocapside interne.

La ribonucléocapside virale, complexe N-ARN, présente un diamètre allant de 30 à 70 nm et une symétrie hélicoïdale d'une périodicité de 4,5 à 5 nm, où une nucléoprotéine lie 9 nucléotides. Elle constitue, lors de son association avec l'ARN polymérase ARN dépendante (L) et, son cofacteur, la phosphoprotéine (P), le complexe ribonucléoprotéique (RNP), structure interne de la particule virale. Le génome viral rabique est un ARN simple brin non segmenté, de polarité négative et de 12 kilobases (kb). Son association avec la N le rend actif pour la transcription et la réplication. Elles sont assurées par le complexe polymérase (L-P), qui porte l'ensemble des activités enzymatiques. La compaction de la RNP est assurée par la M, toutefois l'information structurale est portée par la N, ainsi le complexe N-ARN peut se structurer en balle de fusil en absence de partenaires viraux comme la M (Desfosses, Ribeiro et al. 2013). La RNP, hors de la particule virale, se présente sous forme d'hélice, d'un diamètre d'environ 20 nm, plus relâchée et plus longue que la forme compactée.

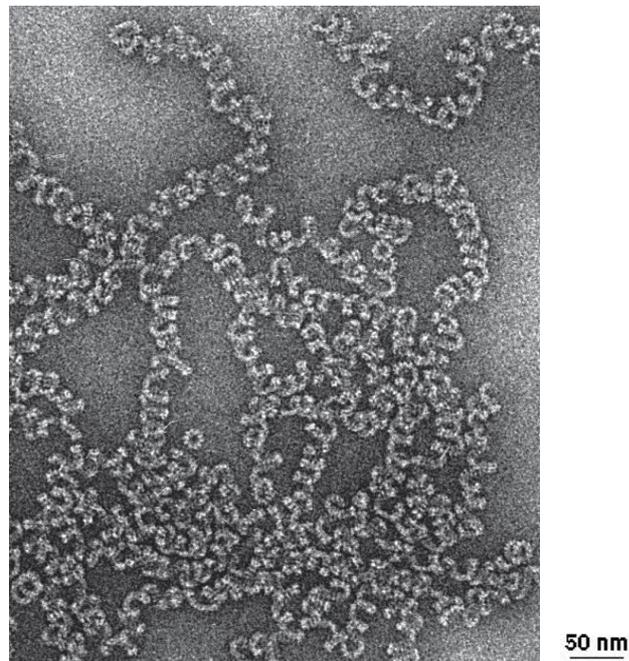


Figure 5 : Photo de microscopie électronique de la nucléocapside (N+ARN) du virus de la rage
(Ruigrok, Crepin et al. 2011)

G. Organisation du génome rabique

Le génome du virus de la rage est un ARN monocaténaire non segmenté de polarité négative d'environ 12 kb. Il code successivement, de l'extrémité 3' à l'extrémité 5', pour cinq protéines virales, N-P-M-G-L (Cf.fig.6).

Il est structuré par deux séquences non codantes à l'extrémité 3' et 5', respectivement l'ARN Leader de 58 nucléotides et la région Trailer de 70 nucléotides (Tordo, Poch et al. 1986, Tordo, Poch et al. 1988). Elles encadrent cinq gènes viraux transcrits en ARNm codant successivement la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la matrice (M), la glycoprotéine (G) et la polymérase (L) (Flamand and Delagneau 1978). Chacun des gènes est bordé par des signaux d'initiation (TIS pour Transcription Initiation Signal) et de terminaison de la transcription (TTP pour Transcription Termination and Polyadenylation signal) et séparés par des régions intergéniques non transcrites. Ces régions sont de tailles variables, allant de 2 à 6 nucléotides sauf pour la région intergénique G/L, qui fait 25 nucléotides (souche PV) et fait suite à une longue région non codante de l'ARNm G qui pourrait correspondre à un pseudogène (Tordo, Poch et al. 1986). Les régions Leader et Trailer contiennent les promoteurs de la transcription et de la réplication, ainsi que les signaux d'encapsidation des ARN, de taille génomique, néosynthétisés.

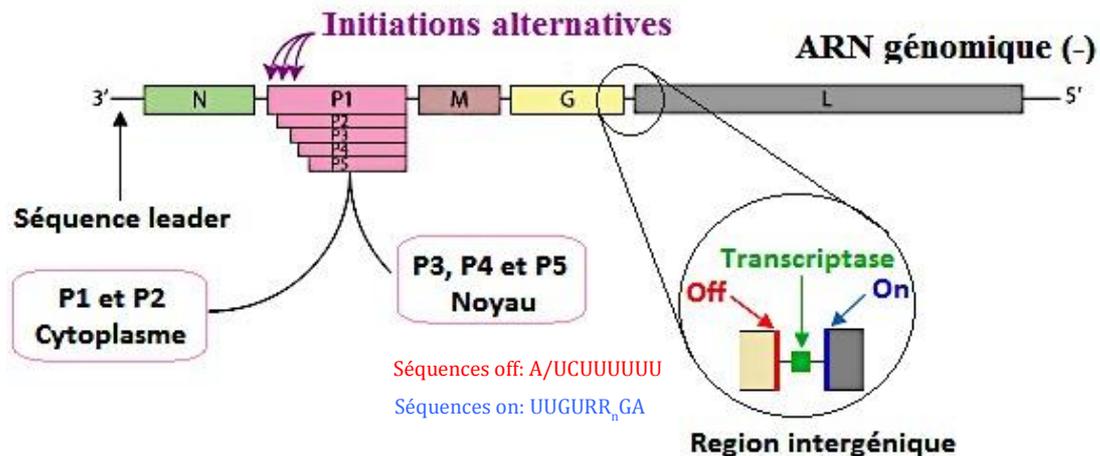


Figure 6 : Représentation schématique du génome du virus de la rage

Le génome rabique est un ARN négatif simple brin qui code, successivement de 3' à 5', cinq protéines : la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la protéine de Matrice (M), la glycoprotéine G et la polymérase (L pour Large), ainsi que quatre sous produits de la P issues d'initiation alternatives (P2, P3, P4 et P5). Ces gènes sont encadrés par deux séquences non codantes, la séquence leader en position 3' et la séquence trailer en position 5', et sont séparés les uns des autres par des régions intergéniques. (D'après Viralzone)

H. Cycle viral rabique

Le virus de la rage est essentiellement neurotrope *in vivo* (Lafon 2005), bien que plusieurs souches ont été adaptées à divers types cellulaires afin d'étudier le cycle répliatif rabique. Ce cycle est cytoplasmique, avec toutefois quelques sous produits de la protéine P qui sont recrutés dans le noyau (cf.I.2). Il s'initie par la reconnaissance de récepteurs sur les cellules cibles par la glycoprotéine G, ce qui conduit à l'endocytose de la particule virale puis à la libération pH dépendant de la RNP dans le cytoplasme. À la suite de cette première étape, l'ARN viral encapsidé par la nucléoprotéine (ARN-N) est utilisé comme matrice par la polymérase L et, son cofacteur, la phosphoprotéine P pour réaliser sa transcription puis sa répliation. Ces deux activités enzymatiques ont lieu dans une inclusion cytoplasmique virale induite appelée Corps de Negri (CN). La traduction des ARNm viraux est prise en charge par la machinerie cellulaire. À la suite de la répliation, les néo-particules sont assemblées et, par transport intracellulaire microtubulaire dépendant (Nikolic, Le Bars et al. 2017), vont bourgeonner à la membrane plasmique (Cf.fig.7).

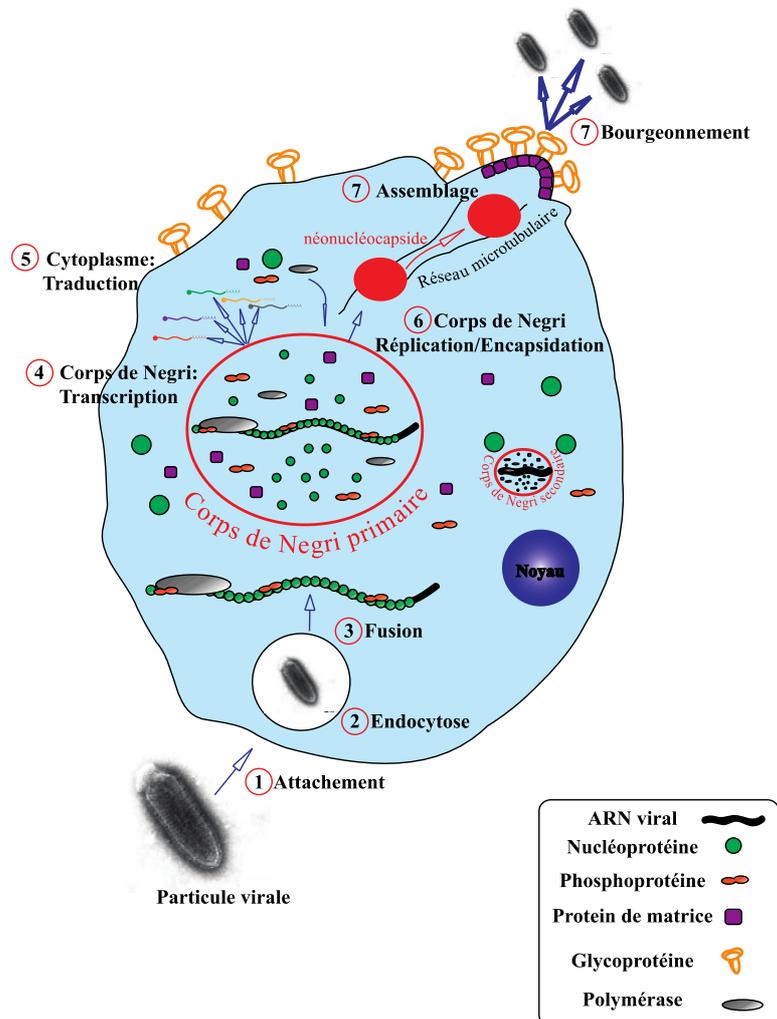


Figure 7 : Cycle réplcatif du virus de la rage

(1) Le cycle réplcatif rabique débute par la reconnaissance de récepteurs spécifiques via la G, ce qui permet l'endocytose de la particule (2) et la libération pH dépendant de la RNP dans le cytoplasme de la cellule (3). (4) Le génome viral est alors transcrit par le complexe polymérase (L-P) pour la synthèse des protéines virales qui conduit, par recrutement, à la formation du corps de Negri primaire. (5) La traduction des ARNm viraux est prise en charge par la machinerie cellulaire dans le cytoplasme de la cellule. (6) Dès lors qu'une quantité suffisante de protéine virale pour l'encapsidation du génome viral et la production de particules virales est disponible, la polymérase passe en mode réplcasse. Des RNPs bourgeonnent du corps de Negri primaire et s'associent au réseau microtubulaire pour leur transport intracellulaire. Une partie de ces RNPs forment des corps de Negri secondaires, qui assurent les mêmes fonctions que le corps de Negri primaire, tandis qu'une autre partie des RNPs est transportée jusqu'à la membrane plasmique. (7) Un regroupement de protéine M en position sous membranaire permet de concentrer la glycoprotéine, d'encapsider la RNP et d'invaginer la membrane pour le bourgeonnement et la libération de nouvelles particules virales.

1. Entrée du virus de la rage

a) Les récepteurs

Le virus de la rage peut utiliser deux mécanismes pour pénétrer dans une cellule. L'adsorption sur la membrane plasmique est largement utilisée par de nombreux virus. Elle a comme avantage de n'utiliser aucun récepteur et donc d'être non saturable, et présente un processus d'internalisation non spécifique, comme c'est le cas pour les solutés ou les petites particules. Ce premier mécanisme est plus largement utilisé par le virus dans des conditions *in vitro*. Le second mécanisme utilisé est l'endocytose de la particule virale induite par la reconnaissance de récepteurs cellulaires. Cette reconnaissance, plus efficace que l'adsorption, est permise par la glycoprotéine G, présente à la surface du virion. Deux types de molécules sont proposées comme récepteurs du virus de la rage : des récepteurs non protéiques ou protéiques.

L'étude des récepteurs de nature non protéiques, des glucides (Conti, Superti et al. 1986), des gangliosides (Superti, Hauttecoeur et al. 1986) et des phospholipides (Superti, Derer et al. 1984, Wunner, Reagan et al. 1984), n'établit pas clairement s'ils sont suffisants pour la fixation et la pénétration du virus rabique dans les cellules, ou s'ils agissent en conjonction avec un ou plusieurs récepteurs protéiques.

Trois candidats représentent les récepteurs protéiques : le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAchR) (Lentz, Burrage et al. 1982, Lentz, Burrage et al. 1983), le récepteur basse affinité du NGF (p75^{NTR}) (Tuffereau, Desmezieres et al. 2001) et la « *Neural cell*

adhesion molecule » (NCAM) (Thoulouze, Lafage et al. 1998). Le récepteur nAChR appartient à la superfamille des récepteurs canaux ioniques ligand-dépendants. Bien que ce récepteur soit important, le virus rabique est capable d'infecter des cellules qui ne présentent pas cette molécule, indiquant qu'il n'est pas l'unique récepteur pour l'infection virale. Actuellement, le rôle décrit du récepteur nAChR serait d'amplifier la production virale intracellulaire (Davis, Rall et al. 2015) (Cf.fig.8). p75^{NTR} est un récepteur aux neurotrophines (NGF, BDNF, NT-3 et NT-4), dont l'expression est exclusivement neurale, cellule souche donnant les neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Bien que les espèces *Rabies Lyssavirus* et *European Bat 2 Lyssavirus* lient ce récepteur (Tuffereau, Desmeziers et al. 2001), tous les neurones qui expriment p75^{NTR} ne sont pas sensibles au virus (Tuffereau, Schmidt et al. 2007). Le rôle du récepteur p75^{NTR} est actuellement décrit pour le routage des endosomes contenant les particules virales le long des microtubules (Cf.fig.9). NCAM n'a pas une expression exclusivement neuronale, il est également présent chez des cellules musculaires et certaines lignées lymphoblastoïdes. Au même titre que p75^{NTR}, NCAM n'est pas indispensable pour l'infection du virus rabique.

En conclusion, le virus de la rage peut utiliser plusieurs récepteurs, seuls ou en coopération, pour infecter une cellule cible. Encore aujourd'hui, l'identification de ces récepteurs mène à de nombreuses recherches (Wang, Wang et al. 2018).

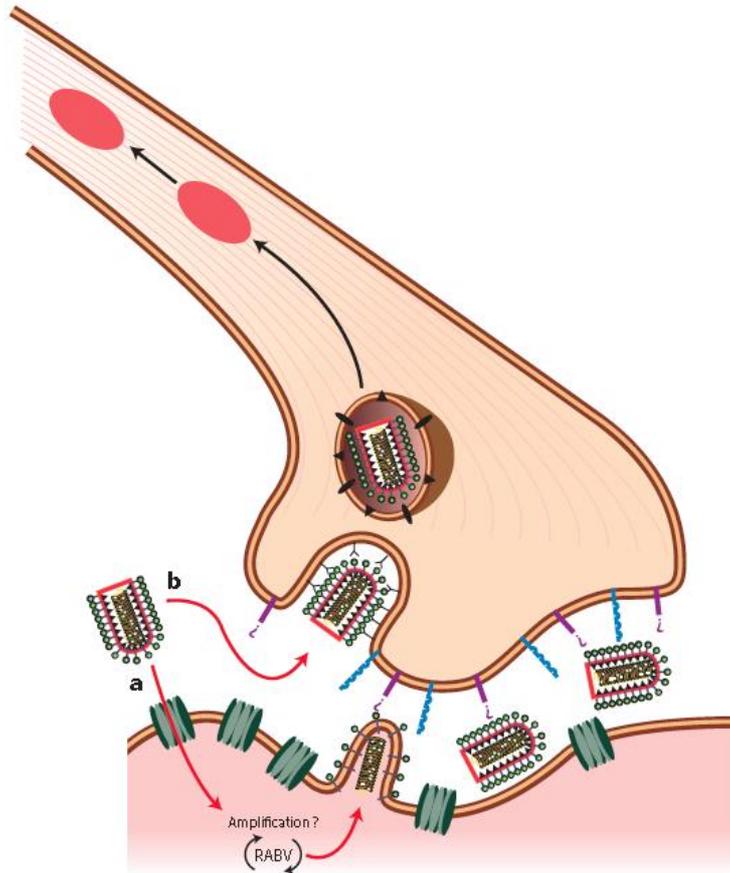


Figure 8 : Rôle des récepteurs nAChR (vert), NCAM (violet) et p75^{NTR} (bleu) au niveau de la jonction neuromusculaire

Le récepteur nAChR est présent sur la face musculaire de la jonction neuromusculaire, tandis que les récepteurs NCAM et p75^{NTR} sont du côté neuronal. Ces derniers permettent le passage du virus dans le système nerveux. Le récepteur nAChR permettrait quant à lui la réinfection des cellules musculaires pour l'amplification du virus (Davis, Rall et al. 2015)

b) Endocytose, fusion et libération des RNPs

Suite à la reconnaissance du récepteur par la glycoprotéine G, il y a endocytose de la particule virale. Des événements d'acidification de l'endosome conduisent aux changements de conformation de la glycoprotéine G, permettant la fusion des membranes virales et endosomales. Trois conformations de la glycoprotéine G sont observées en fonction du pH : une conformation native (pH>7), une conformation inactive (pH<6) et une conformation transitoire impliquée dans l'initiation du mécanisme de fusion. La G a une capacité de fusion maximale entre les pH 5,8 et 6 (Gaudin, Tuffereau et al. 1991). Une caractéristique de la glycoprotéine G des *Rhabdoviridae*, et notamment du virus de la rage, est de pouvoir osciller entre les différentes conformations (Gaudin 2000, Roche and Gaudin 2002), ce qui lui permet

d'être transportée après synthèse dans les compartiments acides de l'appareil de Golgi et de retrouver sa conformation native une fois à la surface des néo-particules virales (Gaudin, Ruigrok et al. 1993). À l'inverse, par exemple, de l'hémagglutinine du virus Influenza, dont la transformation structurale de la forme native à la forme fusogène est irréversible.

Dans le cas de l'infection de cellules fibroblastiques, l'endocytose se fait sur l'ensemble de la surface de la membrane en présence de récepteurs. A l'inverse, dans le cas de neurones, l'infection ou entrée virale se fait principalement par l'extrémité axonale (jonction neuromusculaire ou synapse) notamment parce que le reste du neurone est protégé par la gaine de myéline. Il s'en suit un transport de la RNP/nucléocapside vers le corps cellulaire où ont lieu les transcriptions/répliquions virales. De nombreuses observations avec des virus fluorescents montrent que le transport se fait avec des particules virales complètes (Cf.fig9) (Klingen, Conzelmann et al. 2008, Bauer, Nolden et al. 2014, Gluska, Zahavi et al. 2014). Ces résultats indiquent que le virus est transporté dans des vésicules sur le réseau microtubulaire et que la fusion membranaire se fait au niveau du corps cellulaire. La fusion conduit à la libération de la RNP dans le cytoplasme afin de procéder à l'expression du génome viral.

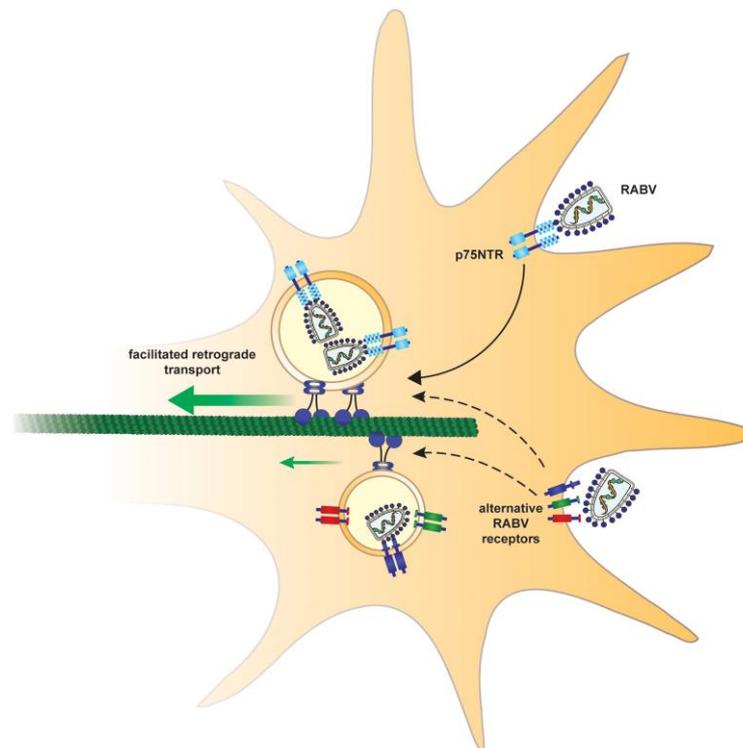


Figure 9 : Représentation schématique du transport rétrograde du virus rabique après infection et implication du récepteur p75^{NTR}

La glycoprotéine permet la reconnaissance de récepteurs spécifiques dont le récepteur p75^{NTR} qui permet l'endocytose de la particule virale et est co-transporté avec la vésicule le long du prolongement neuronale via le transport rétrograde (Roche, Rey et al. 2007, Gluska, Zahavi et al. 2014)

2. Expression du génome viral

La fusion des membranes virales et endosomales permet la libération du génome viral, sous la forme de RNP, dans le cytoplasme. L'ARN génomique (-) est toujours encapsidé par la nucléoprotéine N sous forme de nucléocapside pour le protéger notamment des nucléases cellulaires, et des senseurs de l'immunité. Il en va de même pour l'ARN antigénome (+) qui sera produit après réplication. Cette conformation permet une spécificité de prise en charge par la polymérase rabique du génome et de l'antigénome. Ainsi, c'est l'ARN-N, et non l'ARN nu, qui sert de matrice à la transcription et à la réplication, qui sont réalisées par la polymérase rabique L et son cofacteur la phosphoprotéine P. Ce mécanisme de transcription/réplication est une spécificité du virus rabique et des *Mononegavirales*. Leur ARNs nus ne peuvent être ni transcrits ni répliqués, ils sont donc non infectieux et cela a complexifié le développement de système de génétique inverse.

Les activités enzymatiques de transcription et de réplication se déroulent dans une structure virale induite appelée corps de Negri (CNs), tandis que la traduction des ARNm viraux est prise en charge par la machinerie cellulaire. Les protéines virales synthétisées sont ensuite recrutées dans les CNs.

a) Transcription

La transcription rabique se fait selon le modèle « *start and stop* » (Emerson 1982) avec une initiation à l'extrémité 3' du génome, et une progression jusqu'à l'extrémité 5' permettant la synthèse successive de six transcrits : l'ARN Leader, suivi des ARNm codant la N, la P, la M, la G et la L (Cf.fig.6). Ce mode de transcription a pour effet de créer un gradient d'expression transcriptionnel décroissant de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' du génome rabique. En particulier, la réinitiation de la transcriptase, à la suite d'une non-transcription de la région intergénique, n'est jamais 100% efficace et dépend de la taille de la région intergénique elle-même (Finke 2000). Le complexe N-ARN, lors de sa libération dans le cytoplasme, sert de matrice à la transcription par le complexe polymérase (L-P) (Emerson and Yu 1975, Mellon and Emerson 1978). La transcription se découpe en deux phases : (1) la transcription primaire qui ne se fait qu'avec les composants viraux présents dans les particules virales et (2) la transcription secondaire qui bénéficie des éléments viraux (génomés et protéines) produits suite à la transcription primaire, à leur traduction ainsi qu'à la réplication.

La L possède un mode d'initiation dit « *de novo* », ce qui signifie que l'initiation se fait de façon primer indépendante (Morin, Rahmeh et al. 2012). Il a été décrit que les deux premiers ribonucléotides de l'extrémité 3' étaient essentiels pour l'initiation qui est cependant facilitée par le troisième nucléotide. De plus, il est décrit deux mécanismes distincts pour l'initiation : (1) la synthèse peut se faire par l'extrémité 3' de l'ARN génomique, on parle alors d'initiation externe, ou (2) elle peut s'initier sur la séquence start de chaque gène, on parle alors d'initiation interne. Cette dernière est moins efficace que la première (Emerson 1982, Whelan and Wertz 2002, van Dijk, Makeyev et al. 2004).

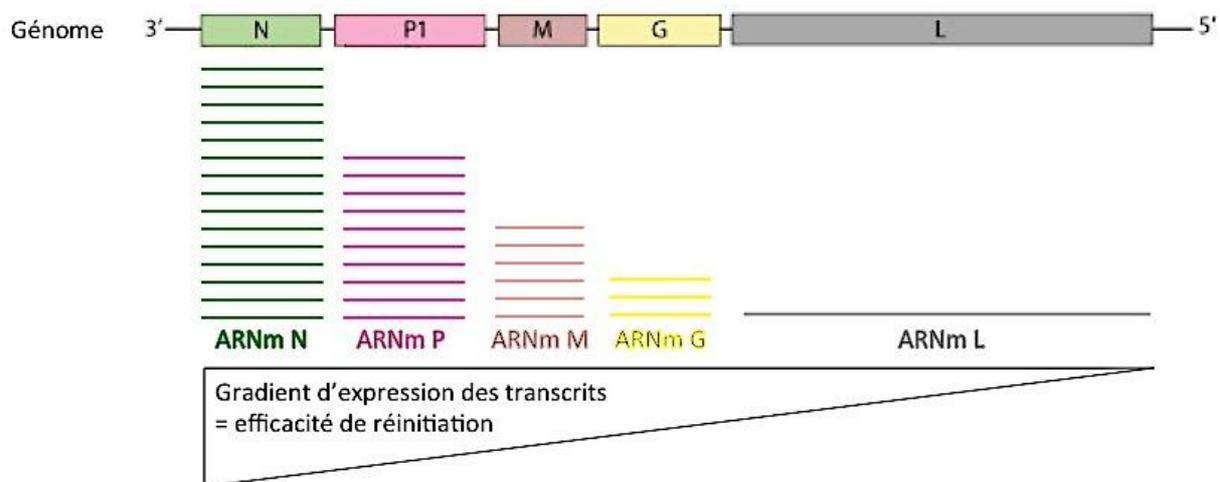


Figure 10 : Représentation schématique du gradient décroissant de l'expression des transcrits rabiques

Le virus de la rage utilise le modèle « start and stop » pour sa transcription, avec une initiation à l'extrémité 3' jusqu'à l'extrémité 5'. Ce mode de transcription permet la synthèse successive de cinq transcrits (ARNm N, P, M, G et L) suivant un gradient d'expression transcriptionnel décroissant de l'extrémité 3' à l'extrémité 5'. Cela étant dû à un défaut de réinitiation de la transcriptase entre chaque gène, influencée notamment par la position du gène par rapport à l'extrémité 3' et par la taille de la région intergénique. (D'après Viralzone)

b) Traduction

La pose de la coiffe et la polyadénylation des ARNm viraux, à l'exception de l'ARN Leader, sont assurées par la polymérase rabique (L).

Le capping des ARNm viraux est assuré par le domaine d'activité PRNTase porté par la polymérase (Cf.I.5.b). L'extrémité 5'-AACAC(C/U) des ARNm, prise comme substrat, est

triphosphorylée, par GDP, pour créer une coiffe G(5')ppp(5')A. Le mécanisme mis en place pour cette coiffe est dit non conventionnel (Cf.I.5.c) (Ogino, Ito et al. 2016).

La polyadénylation en 3' des ARNm viraux est due à un bégaïement de la polymérase sur la séquence TTP (Transcription Terminaison/Polyadénylation) du génome rabique (séquence U₇) qui est présente dans le signal de terminaison de la transcription (Cf.I.5.d).

La traduction des ARNm viraux est prise en charge par la machinerie cellulaire mais implique une voie d'initiation différente de celle majoritairement utilisée par les ARNm cellulaires (Lee, Burdeinick-Kerr et al. 2013) et utilise la protéine RPL40 (sous unité 60S).

c) Réplication

La réplication, contrairement à la transcription, nécessite une disposition continue de protéines virales. Une quantité suffisante de N soluble (N⁰) est nécessaire pour encapsider les ARNs naissants et permettre à la polymérase L et son cofacteur P de passer du mode transcriptase au mode réplique. Les mécanismes qui médient ce changement de mode ne sont pas clairement établis. Ils pourraient mettre également en jeu la protéine M (Cf.I.3) ainsi que des protéines cellulaires dont l'identification fait précisément l'objet de cette thèse.

La synthèse de l'ARN antigénomique, de polarité positive et complémentaire au génome viral, s'initie en copiant ce dernier à partir de son extrémité 3' et se prolonge sur l'intégralité du génome ignorant les signaux d'initiation et de terminaison de la transcription. De même que l'ARN génomique, l'ARN antigénomique est encapsidé par la nucléoprotéine au moment de sa synthèse, grâce à la présence d'un signal d'encapsidation porté par son extrémité 5'. L'association de la N avec l'ARN Leader naissant masquerait les signaux de terminaison de la transcription pour permettre au système de basculer vers la synthèse de l'ARN antigénomique. La P joue un rôle de chaperonne pour la N⁰ et régule son association avec l'ARN génomique et antigénomique. En effet, la formation d'un complexe N⁰-P, empêche d'une part la N soluble d'interagir avec les ARNs cellulaires et d'être toxique pour la cellule, et d'autre part de la maintenir disponible pour l'encapsidation spécifique du génome et de l'antigénome (Mavrakis, Mehous et al. 2006).

L'ARN antigénomique ainsi produit, de manière similaire, sert de matrice au complexe L-P pour la synthèse d'ARN génomique et la production de néo-particules. Bien que les extrémités 3' des ARNs génomiques et antigénomiques soient des promoteurs pour la L, ils n'ont pas la même efficacité de recrutement pour la L-transcriptase (qui n'est efficace

que sur le génome) et pour le L-réplique. En effet, la réplication est asymétrique, beaucoup plus efficace sur la matrice ARN (+) ce qui fait que la quantité d'ARN génomiques produits est cinquante fois plus importante que celle des ARNs antigénomiques (Finke and Conzelmann 1997).

3. Régulation de la synthèse des gènes viraux

Contrairement au VSV qui est un virus cytopathique en raison, en partie, de sa forte réplication, le virus de la rage ne détruit pas les cellules où il se multiplie. Il a mis en place une régulation spécifique lui permettant de maintenir une dissémination optimale, de maintenir la survie cellulaire et d'échapper à la réponse immunitaire. Trois mécanismes de régulation d'expression génique sont principalement utilisés par le virus de la rage :

1) Les régions intergéniques : Le modèle transcriptionnel « *start and stop* » partagé par les *Mononegavirales*, permet une régulation différentielle de l'expression de chaque gène où se combinent : (1) la distance du gène par rapport à l'extrémité 3' du génome où s'initie la transcription ; (2) les régions intergéniques, séquences non transcrites présentes entre chaque gène et qui, proportionnellement à leur taille, influencent négativement la reprise de la transcription. La région intergénique la plus grande se trouve en amont du gène L, également le dernier sur le génome rabique, ce qui a pour effet d'atténuer considérablement la synthèse de la L (Finke, Cox et al. 2000) (Cf.fig10).

2) Terminaison alternative : Certaines souches adaptées en laboratoire (SAD, PV, ERA) et de rares isolats rabiques présentent deux séquences TTPs (Transcription Terminaison/Polyadénylation) pour les gènes codant la M et la G (Conzelmann et al 1990, Tordo and Poch 1988a). Les régions intergéniques sont un élément essentiel dans la régulation de la transcription « *start and stop* ». Ces terminaisons alternatives, qui ont pour effet d'augmenter la taille de ces régions, diminuent l'efficacité de reprise de la transcription du gène suivant. Ce phénomène est variable durant le cycle répliatif et dépendant du type cellulaire.

3) La protéine de matrice (M) : La taille limitée du génome rabique implique une multifonctionnalité pour chacune des protéines virales. Ainsi, la protéine de matrice (M) intervient d'une part dans les processus d'assemblage et de bourgeonnement où elle recrute les RNPs néosynthétisés à la membrane cellulaire pour les condenser et provoquer le

bourgeoisement des néovirions (Mebatsion, Weiland et al. 1999). D'autre part, des études sur les *Rhabdoviridae* ont mis en lumière le rôle de régulateur de la M dans le mécanisme de passage du mode transcriptase à répliqueuse de la polymérase (Finke and Conzelmann 2003, Finke, Mueller-Waldeck et al. 2003). Tout comme pour la protéine N, la quantité disponible de M permettrait de réguler cette balance en inhibant l'activité de transcription du complexe L-P au profit de l'activité répliqueuse.

4. Assemblage des particules et routage vers le site de bourgeoisement

La dernière étape du cycle rabique est l'assemblage des composants viraux, issus de la répliqueuse, et leur bourgeoisement à la membrane plasmique.

Assemblage : Les mécanismes d'assemblage des constituants du virus de la rage sont encore peu connus. Cependant, plusieurs expériences ont montré l'importance de la N dans l'établissement de la structure hélicoïdale de la NC et dans sa formation en balle de fusil (Desfosses, Ribeiro et al. 2013), indépendamment d'autres composants viraux comme la M. L'assemblage de la NC se fait dans la structure virale induite appelée corps de Negri (CNs), d'où elle est expulsée pour s'associer au réseau microtubulaire et être transportée vers le site de bourgeoisement (Lahaye, Vidy et al. 2009, Nikolic, Le Bars et al. 2017).

Routage : Bien qu'il ait été montré une indépendance du réseau microtubulaire durant la mise en place du/des CNs primaires dans les cellules fibroblastiques (Lahaye, Vidy et al. 2009), celui-ci est largement utilisé pour la dissémination virale du site d'inoculation vers le SNC et le transport intracellulaire (Nikolic, Le Bars et al. 2017), notamment dans les cellules neuronales. Le transport viral se découpe en deux phases : (1) le transport rétrograde des particules infectieuses, de la jonction neuromusculaire ou de la synapse, vers le corps cellulaire et (2) le transport antérograde post-répliqueuse des néoparticules dans les neurites vers le site de bourgeoisement. La vitesse de déplacement du virus en antérograde est de 3,4 μ m/s et de 1,6 μ m/s pour le rétrograde, démontrant un système actif qui fait probablement intervenir des systèmes kinésine- (antérograde) et dynéine (rétrograde) -dépendants (Bauer, Nolden et al. 2014). De plus, des études ont montré que la RNP et la G étaient co-transportées le long de l'axone lors du transport rétrograde vers le corps cellulaire et que la déplétion de la G inhibait

ce transport. Concernant le transport antérograde, deux hypothèses sont actuellement émises : (i) des particules complètes ou (ii) un co-transport de la RNP et de la G contenues dans des vésicules, vers le site de bourgeonnement (Klingen, Conzelmann et al. 2008, Bauer, Nolden et al. 2014, Gluska, Zahavi et al. 2014).

Bourgeonnement : Le bourgeonnement du virus de la rage est porté par les protéines M et G.

Des études sur la protéine M rabique montrent qu'un virus dépourvu de cette protéine bourgeonne 500 000 fois moins qu'un virus qui la possède (Mebatsion, Konig et al. 1996). De la même façon, l'expression de la M seule permet la formation de VLPs (*Virus-Like Particles*) en l'absence d'autres protéines virales (Jayakar, Jeetendra et al. 2004, Wirblich, Tan et al. 2008, Harty, Schmitt et al. 2011), démontrant que la M porte une information nécessaire au bourgeonnement. Cette caractéristique est partagée par la protéine M de VSV, la protéine gag des rétrovirus et la protéine VP-40 des *Filovirus*. Ces protéines ont la capacité d'interagir avec la bicouche lipidique pour le bourgeonnement, de s'auto-assembler en homo-oligomères et de présenter un ou plusieurs L-domaines (*Late Budding Domain*). Ces domaines permettent à la protéine M rabique d'interagir avec plusieurs voies d'excrétions cellulaires (Jayakar and Whitt 2002, Chen and Lamb 2008). Un L-domain peut être composé de quatre motifs différents : PPxY, PT/SAP, YxxL et FPIV. La protéine M de la rage porte le motif PPEY dans sa partie N-terminale en position 35-38 ainsi qu'un second domaine YxxL moins bien caractérisé. Le L-domain permet de recruter la machinerie ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) pour permettre la séparation virus cellule (Taylor, Hanson et al. 2007).

La glycoprotéine G joue un rôle dans ce mécanisme en tant que support en s'accumulant au niveau de micro-domaines membranaires pour la formation d'un treillis de protéine M, ce qui permet l'incurvation de la membrane pour le bourgeonnement (Garoff, Hewson et al. 1998, Schnell, Buonocore et al. 1998). La déplétion de la glycoprotéine G entraîne une diminution d'efficacité de bourgeonnement d'un facteur 10 à 30, moins importante toutefois que la diminution suite à la déplétion de la M (Mebatsion, Konig et al. 1996).

I. Les protéines rabiques

Le virus de la rage exprime durant son cycle répliatif cinq protéines, N, P, M, G et L, ainsi que quatre sous produits de la P, issus d'initiations alternatives. Ces protéines multifonctionnelles sont toutes présentes dans la particule virale. De l'extrémité 3' à 5' se trouve, la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la glycoprotéine (G) et la polymérase (L pour Large) (Cf.fig.6). Leur position séquentielle sur le génome permet un contrôle de leur quantité, relative à leur distance de l'extrémité 3'.

1. La nucléoprotéine

Le gène qui code la N est le premier sur le génome viral, suggérant que la N est nécessaire en quantité importante durant le cycle. En effet, la N encapside le génome, et l'antigénome, que ce soit dans la particule virale ou dans la cellule infectée. Lorsque la N est associée à l'ARN viral, environ 2000 molécules pour recouvrir l'ARN complet, elle forme la ribonucléonucléocapside (NC) hélicoïdale. Cette association a pour but de protéger le génome viral des dégradations cellulaires, par les nucléases par exemple, et d'empêcher sa reconnaissance par les senseurs de l'immunité innée (RIG-I, MAVS).

L'affinité de la N pour l'ARN est indépendante de la nature ou de l'origine de ce dernier. La protéine N s'associe et forme des complexes N-ARN hélicoïdaux lorsqu'elle est produite en bactérie ou en cellule eucaryote (Iseni, Barge et al. 1998). Il n'est pas exclu cependant, quoique non démontré à l'heure actuelle, que la N ait une affinité plus grande pour les signaux aux extrémités du génome, promoteurs de l'encapsidation.

Un protomère de N est capable de lier 9 nucléotides via le squelette ribose-phosphate de la molécule ARN. Cette caractéristique de liaison expliquerait qu'il n'y ait pas de spécificité de séquence. La structure de ce complexe N-ARN a été obtenue par cristallographie et diffraction aux rayons X (Albertini, Wernimont et al. 2006). Elle a permis d'identifier une cavité, où est encastré l'ARN, formée par des résidus basiques, ainsi que deux domaines, Nterminale et Cterminale de la N qui forment des « bras » permettant l'interaction entre protomères voisins et la rigidité de l'hélice.

Comme la N lie non spécifiquement l'ARN, sa forme libre (N^0) est présente au cours de l'infection en association avec la P (Mavrakis, Iseni et al. 2003). Ce complexe forme la réserve de N nécessaire à l'encapsidation du génome et de l'antigénome lors des étapes de transcription et de réplication.

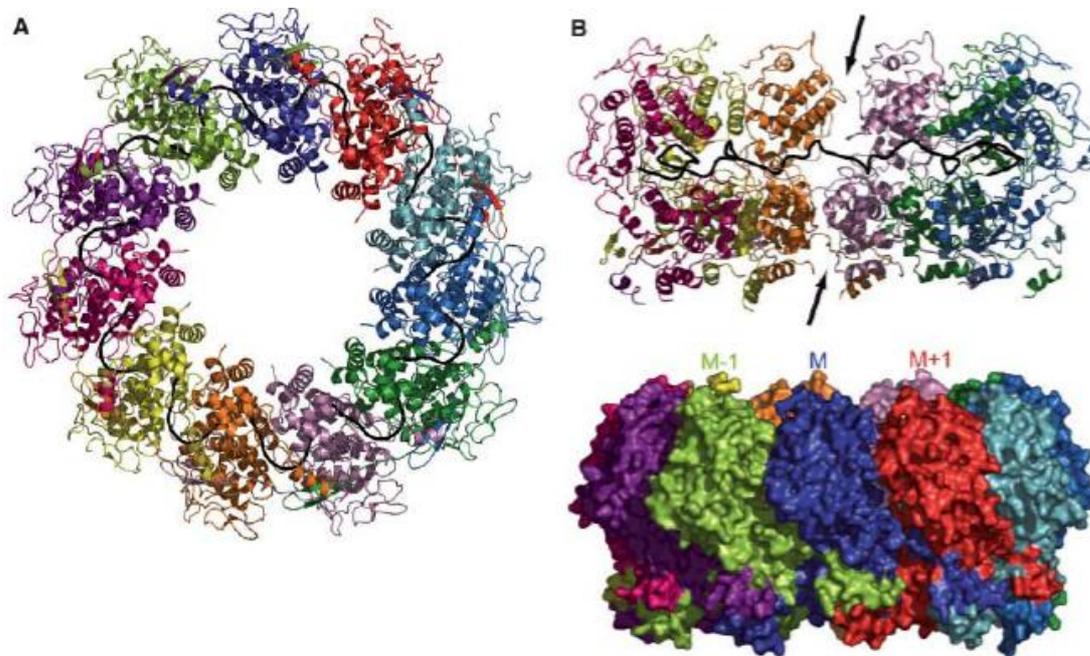


Figure 11 : Représentation de la nucléoprotéine N du virus rabique avec l'ARN

A) Représentation de 11 monomères de N de la rage, de différentes couleurs, formant un anneau avec l'ARN en noir, vue du dessous.

B) Anneau N-ARN, vue de côté, représentant les interactions des monomères M-1, M et M+1, et l'emplacement de l'ARN, en noir.

(Albertini, Wernimont et al. 2006)

2. La phosphoprotéine

Second gène présent sur le génome viral, la phosphoprotéine, (297 acides aminés) qui est le cofacteur de la polymérase L, joue un rôle clé durant l'infection en interagissant avec de multiples partenaires cellulaires. Malgré son rôle déterminant dans le cycle réplcatif, la P est la protéine la moins conservée chez les *Lyssavirus* avec seulement 50% de similarité en acides aminés pour les génotypes les plus éloignés (Bourhy, Kissi et al. 1993). La taille de la P varie de 297 à 305 acides aminés selon les espèces de *Lyssavirus*. On remarque deux régions conservées entre les résidus 1-50 (C1) et 200-245 (C2), deux régions variables entre les

résidus 61-81 (V1) et 134-180 (V2) et un domaine de dimérisation (résidus 87-132). La structure du domaine de dimérisation et du domaine C-terminal globulaire ont été résolus (Mavrakis, McCarthy et al. 2004, Ivanov, Crepin et al. 2010) (Cf.fig12). Il est plus complexe de cristalliser la partie NH2 de la molécule, qui n'acquière probablement sa structure qu'en interagissant avec des partenaires.

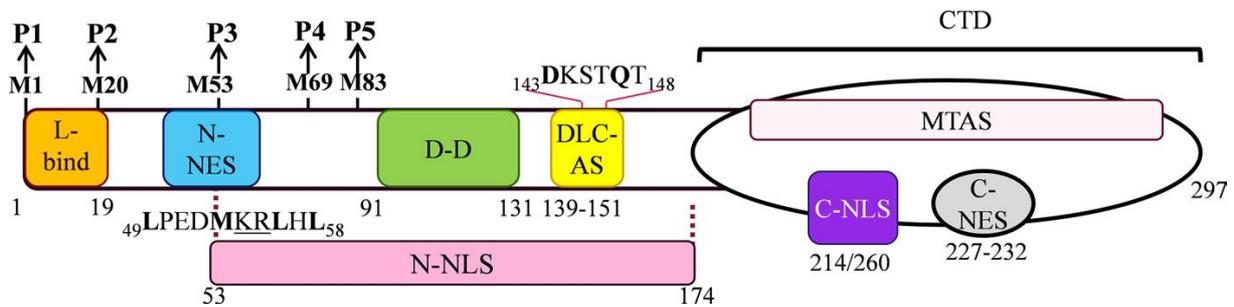


Figure 12 : Représentation schématique de la phosphoprotéine rabique

L-Bind : site de liaison à la polymérase, N-NES : Signal d'export nucléaire en Nterminale, N-NLS : Signal de localisation nucléaire en Nterminale, D-D : Dimérisation Domain, DLC-AS : Dyneine Light Chain association, CTD : C-terminal Domain, MTAS : Microtubule Associated Sequence, C-NLS : Signal de localisation nucléaire en Cterminale, C-NES : Signal d'export nucléaire en Cterminale (Oksayan, Wiltzer et al. 2012)

a) La P et ses sous formes

Pour le gène de la P, le virus de la rage a mis en place une stratégie qui lui permet d'augmenter le nombre de protéines synthétisées en conservant une taille de génome inchangée. Cette production se fait par le mécanisme d'initiation alternative ou *leaky-scanning* (Chenik, Chebli et al. 1995), qui est aussi utilisé par d'autres virus comme par exemple le VSV où les ARNm de la M et de la P codent pour deux protéines supplémentaires (Spiropoulou and Nichol 1993, Jayakar and Whitt 2002). Ce mécanisme permet aux ribosomes d'initier la traduction de l'ARNm à partir de différents AUG (position 20, 53, 69 et 83) qui sont dans le même cadre de lecture que le premier codon initiateur. Le contexte Kozak de ce premier AUG est « faible » et ne permet pas qu'il soit reconnu par tous les ribosomes qui vont alors continuer leur parcours sur l'ARNm jusqu'à l'AUG suivant et ainsi de suite. Quatre sous produits de la P, en plus de la forme totale, sont ainsi synthétisés : P2, P3, P4 et P5 (Chenik, Chebli et al. 1995) (Cf.fig13). Ces différentes P sont aussi bien présentes dans la

cellule infectée que dans le virion, de plus, les sous formes P2 et P3 sont retrouvées chez tous les *Lyssavirus*, ce qui démontre leur importance.

Les sous produits sont délétés respectivement de 20, 53, 69 et 83 résidus au niveau de leur partie N-terminale (Cf.fig13). Cette délétion progressive conditionne leur localisation nucléo-cytoplasmique. En effet, la protéine P porte un premier motif NES (*Nuclear export Signal*) CRM1 dépendant du coté N-terminal (résidus 49 à 58) et un deuxième dans sa partie C-terminale (résidus 227 à 232), qui n'est exposé que lors de la phosphorylation de la sérine 210 (Moseley, Filmer et al. 2007). Elle porte également un motif NLS (*Nuclear Localisation Signal*) fractionné sur sa partie C-terminale (résidus 211 à 214 et 260) et un linéaire entre les résidus 53 et 174 (Pasdeloup, Poisson et al. 2005, Oksayan, Wiltzer et al. 2012). En fonction de la disparition progressive des signaux du côté N-terminal, les protéines changent leur localisation nucléaire (ainsi les P3 à P5 qui ont perdu le NES N-terminal se retrouvent dans le noyau) ou perdent leur capacité à interagir avec des protéine virales ou cellulaires, par exemple par délétion du site de liaison à la polymérase L.

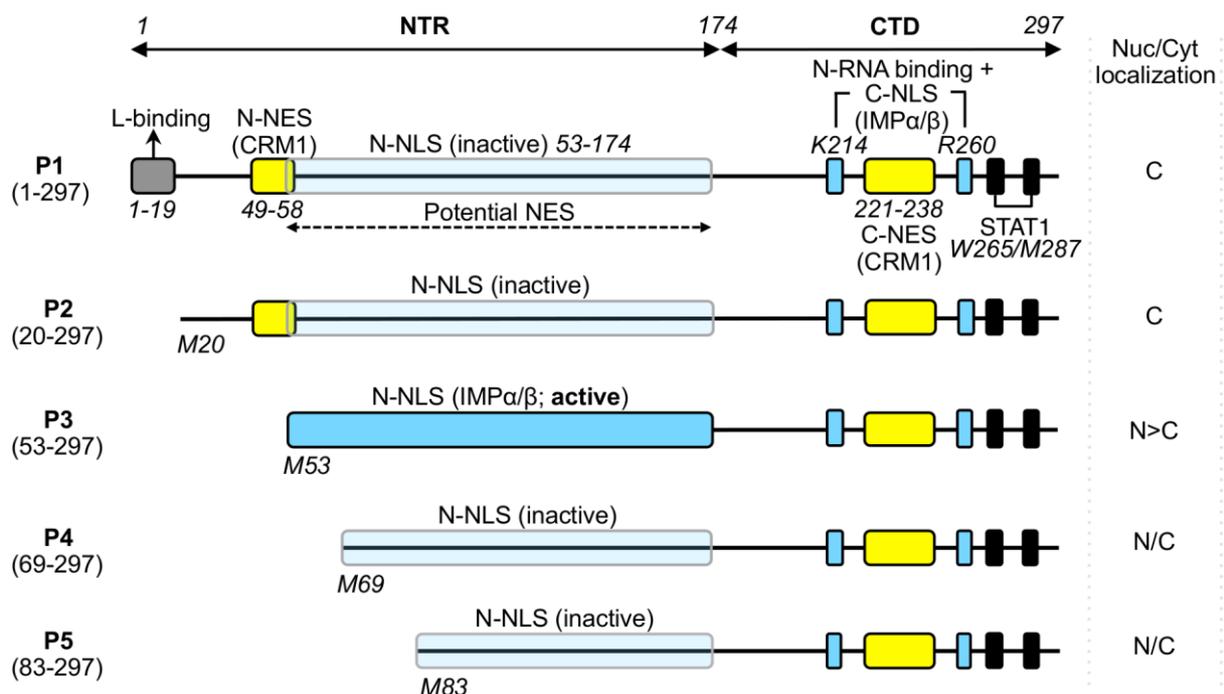


Figure 13 : Représentation schématique de la phosphoprotéine totale (P1) et de ses quatre sous produits (P2, P3, P4 et P5)

Les sous produits P2, P3 P4 et P5 sont issus d'initiations alternatives présentes sur le gène codant la phosphoprotéine totale (P1) et sont respectivement délétés des résidus 20, 53, 69 et 83 en position Nterminale. Cette délétion permet de moduler la localisation subcellulaire des différents sous produits avec « l'activation » de signaux de localisation ou d'export nucléaire. Ainsi, les protéines P1 et P2 sont strictement cytoplasmiques, tandis que les protéines P3, P4 et P5 peuvent être présentes dans le noyau. (Rowe, Wagstaff et al. 2016)

b) La P et ses phosphorylations

La protéine P est une protéine phosphorylée par deux kinases : la protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle les sérines en position 162, 210 et 271, et la *rabies virus protein kinase* (RVPK) de 72kDa qui phosphoryle les sérines en position 63 et 64 (Gupta, Blondel et al. 2000). Tout comme pour la P de VSV, phosphorylée par les kinases caséine kinase II (CKII) et LAK, il existe deux formes phosphorylées de la P rabique : une forme hypophosphorylée (p36 selon son poids moléculaire) et une autre hyperphosphorylée (p40 selon son poids moléculaire). Les kinases, RVPK et PKC, sont incorporées dans le virion, de même que les kinases du VSV ou d'autres *Mononegavirales* comme le virus Sendai. Bien que le rôle de ces phosphorylations pour la P de la rage ne soit pas clairement établi, elles interviendraient dans des processus de régulation comme la localisation subcellulaire. Elles sont en revanche mieux étudiées pour VSV où la phosphorylation de la P est nécessaire pour son oligomérisation (Gao, Greenfield et al. 1996) et la régulation de la transcription virale (Pattnaik, Hwang et al. 1997). Ces phosphorylations ne sont pas requises pour l'oligomérisation de la P rabique, mais seraient importantes dans la stabilisation des oligomères pour l'interaction avec la L.

c) La protéine P : interface entre virus et cellule infectée :

La P est une protéine multifonctionnelle qui est caractérisée par les interactions multiples qu'elle développe avec les autres protéines virales comme avec les protéines cellulaires.

Interaction P et N : Cette interaction avec la N est la mieux étudiée pour la P. Il existe deux domaines indépendants d'interaction avec la N : le premier nécessitant les quarante premiers résidus de la P pour interagir avec la N libre ou N⁰ (Jacob, Real et al. 2001, Mavrakis, Mehoulas et al. 2006, Castel, Chteoui et al. 2009). Ce complexe est formé d'une molécule N et d'un dimère de P. Cette interaction permet de constituer un stock de N soluble nécessaire à la réplication et d'empêcher la N d'encapsider les ARNs cellulaires et de se polymériser. Le second est porté par les 30 acides aminés C-terminaux de la P et lie la N uniquement associée à l'ARN viral. La P joue ici le rôle de lien entre le génome ou antigénome viral encapsidés par la N et la polymérase L (Mavrakis, McCarthy et al. 2004).

Pour la N, le domaine responsable de cette interaction est son domaine C-terminal (résidus 376 à 450) tandis que la partie N-terminale (résidus 1 à 376) comprend le domaine de liaison à l'ARN (résidus 298 à 352) et le site de multimérisation (Kouznetzoff, Buckle et al. 1998, Jacob, Real et al. 2001).

Interaction P et L : Son interaction avec la L requiert les 19 acides aminés N-terminaux de la P et les 566 acides aminés C-terminaux de la L. Les résidus en position 20 à 52 de la P joueraient le rôle de stabilisateur pour cette interaction. L'association de ces deux protéines forme ainsi le complexe polymérase nécessaire à la transcription et à la réplication du virus, où la P est le cofacteur de la L (Chenik, Schnell et al. 1998, Jacob, Real et al. 2001, Castel, Chteoui et al. 2009).

Interaction P et protéines cellulaires : Les nombreuses interactions de la P avec des partenaires cellulaires illustrent parfaitement son rôle d'interface avec la cellule infectée en vue d'une production virale optimale. En premier lieu, il a été montré que la P a la capacité d'empêcher la synthèse d'interféron (Vidy, Chelbi-Alix et al. 2005, Chelbi-Alix, Vidy et al. 2006, Vidy, El Bougrini et al. 2007). La P interagit, grâce aux résidus 173 à 297, avec la protéine STAT-1 (*Signal Transducteur and Activation of Transcription 1*) qui est un facteur de transcription des ISG (*Interferon Stimulating Gene*) activé en réponse à l'interféron α , β ou γ . Cela conduit à sa phosphorylation et sa translocation dans le noyau. Son interaction avec la P empêche son transport nucléaire et bloque la production des ISG. De plus, la protéine P3 a la capacité de bloquer l'interaction de STAT-1 avec l'ADN au niveau du noyau. La protéine P est également capable d'interagir avec des ISG tels que la protéine PML III (*Pro-Myelocytic Leukemia*) via ses résidus 222 à 297 (Blondel, Regad et al. 2002). PML, qui est induite par l'interféron, est présente dans les corps nucléaires et présente un fort effet antiviral, notamment sur le virus de la rage (Everett and Chelbi-Alix 2007, Blondel, Kheddache et al. 2010). L'interaction de cette protéine avec la P conduit à sa séquestration dans le cytoplasme avec un réarrangement des corps nucléaires par la protéine P3. La P agit donc en différents points du mécanisme de l'interféron pour bloquer son action : sa production, la stimulation de la cellule et l'action même de certains ISG.

La P entreprend d'autres interactions avec des partenaires cellulaires dont le rôle reste encore incompris. La P peut interagir, avec ses résidus 139 à 151, avec la chaîne légère de la dynéine 8 (LC8) (Jacob, Badrane et al. 2000, Raux, Flamand et al. 2000). L'hypothèse initiale

était que cette interaction pouvait servir d'adaptateur entre la RNP et la dynéine pour médier le transport de la NC via le réseau microtubulaire. Cependant, des expériences de délétion du domaine de liaison à LC8 sur la P ont montré que le transport axonal n'est pas affecté (Mebatsion 2001). En revanche cette interaction aide la transcription primaire du génome dans le SNC (Tan, Preuss et al. 2007). D'autre part, la *Focal Adhesion Kinase* (FAK), qui est une tyrosine kinase cellulaire, interagit avec la P sur ses résidus 106 à 131 (Fouquet, Nikolic et al. 2015). L'inhibition d'expression de FAK dans une cellule ou le blocage de l'interaction, affectent négativement la réplication du virus et altèrent sa multiplication. Enfin, la protéine P3 interagit avec la nucléoline, via son domaine C terminal (Oksayan, Nikolic et al. 2015). Cette interaction conduit à la relocalisation de P3 dans les nucléoles pour optimiser la réplication virale.

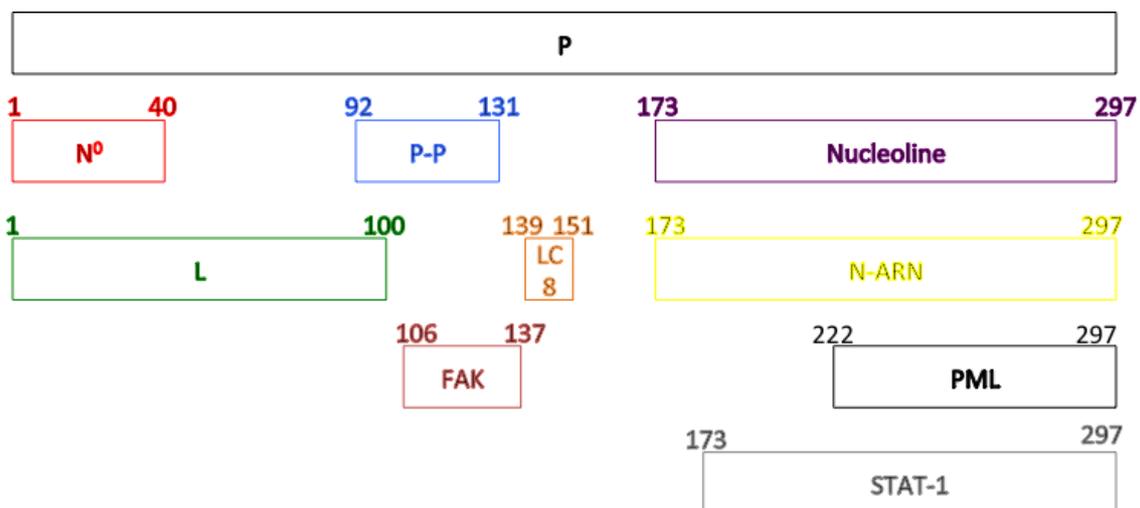


Figure 14 : Représentation des domaines d'interaction de la protéine P avec ses partenaires viraux et cellulaires.

3. La protéine de Matrice

La protéine de Matrice (M) est une protéine aux multiples fonctions durant le cycle viral. Cela s'illustre par ses diverses localisations : cytoplasmique, nucléaire, mitochondriale, sous membranaire ou encore dans le virion.

Des études sur la M de VSV ont montré un rôle de cette protéine dans l'étape de libération de la RNP dans le cytoplasme. En effet, l'acidification de l'endosome conduit non

seulement au changement de conformation de la G déclenchant la fusion des membranes virales et endosomales mais aussi à l'acidification de la particule virale. Cette acidification a pour effet de faciliter la dissociation du complexe M-RNP. Autrement dit, la M, tout comme la G, subit un changement de conformation pH dépendant, ce qui réduit ses interactions avec la RNP (Mire, Dube et al. 2009) et qui la maintient associée aux membranes endosomales. (Mire, White et al. 2010).

D'autre part, la M est impliquée dans le passage de l'activité transcriptase à l'activité répliquase de la polymérase rabique en inhibant la transcription au profit de la réplication (Finke, Mueller-Waldeck et al. 2003). A l'heure actuelle, le mécanisme impliqué n'est pas connu mais plusieurs hypothèses sont émises : (1) la fixation de la M sur la polymérase pour passer en mode répliquase, (2) une action de la M sur des facteurs cellulaires, à identifier, qui pourraient influencer l'activité de la L ou (3) une fixation de la M sur la RNP qui favoriserait sa réplication.

La protéine M joue un rôle primordial dans l'assemblage de la particule virale. Des études de cryoélectromicroscopie sur des virions du VSV ont permis de définir que la matrice est en position sous membranaire, en interaction avec la G, et est disposée en une couche hélicoïdale entourant la nucléocapside (Gaudier, Gaudin et al. 2002).

Finalement, elle intervient également dans l'étape de bourgeonnement des néo-particules virales où elle y joue un rôle majeur. La M porte deux domaines, distincts de ceux responsables de l'interaction avec la RNP (Finke and Conzelmann 2003), pour la formation d'un maillage sous membranaire, au niveau des sites de bourgeonnement marqués par une accumulation de la G.

Enfin, la protéine M du virus de la rage assure de nombreux rôles pour potentialiser la cellule à une production virale optimale. Ainsi, elle peut interagir avec le complexe d'initiation de la traduction, via la sous unité h d'eIF3. Cela lui permet de s'associer avec la sous unité ribosomique 40S pour inhiber la traduction des ARNm cellulaires portant un 5'UTR classique (Komarova, Real et al. 2007). Elle intervient également dans l'apoptose à différents degrés et cette intervention corrèle avec la pathogénicité du virus. En effet, elle peut induire l'apoptose par la voie TRAIL (*Tnf-related apoptosis inducing ligand* pour ligand inducteur d'apoptose lié à un facteur de nécrose tumorale), qui induit l'activation de la voie caspase 8, 3 et 6 (Kassis, Larrous et al. 2004). Cette induction est observée plus précocement chez les souches les moins pathogènes dont la protéine M interagit avec la sous unité I de la cytochrome c oxydase conduisant à un stress hypoxique (Gholami, Kassis et al. 2008). Il en résulte une mort des cellules par nécrose et apoptose. Cette mort cellulaire viro-induite

constitue un mécanisme de limitation de l'infection virale, de la virulence et de la propagation virale. Plus récemment, des études ont montré que la M de la rage pouvait interagir avec la protéine RelAp3 pour bloquer la voie NF- κ B et l'expression de facteurs tels que l'IFN, TNF, IL8 et CXCL2 (Besson, Sonthonnax et al. 2017). De la même façon, la M régule positivement la cofiline phosphorylée permettant la polymérisation de l'actine et ainsi un bourgeonnement plus efficace (Zan, An et al. 2016).

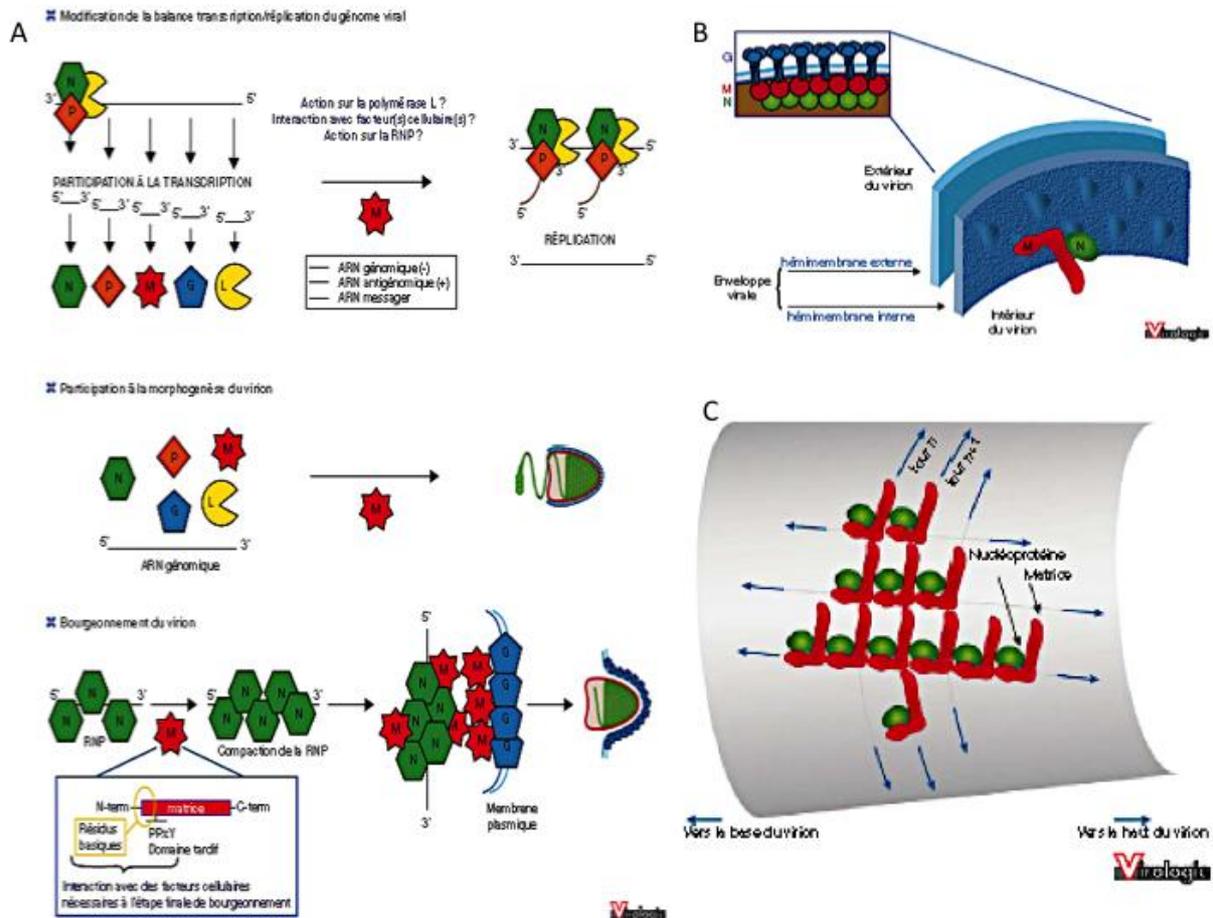


Figure 15 : La protéine M du virus de la rage.

(A) Représentation des rôles assurés par la protéine M : la protéine M favorise la réplication du génome viral en inhibant sa transcription via des mécanismes encore inconnus.

(B et C) Disposition et emplacement de la protéine M dans la particule virale : la protéine M joue un rôle dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales. Sa position sous membranaire permet de condenser la G, d'encapsider la RNP et d'invaginer la membrane plasmique.

(Luco S et al, 2010)

4. La glycoprotéine

Les virus enveloppés présentent à leur surface une ou plusieurs protéines transmembranaires et le virus de la rage ne fait pas exception. La glycoprotéine (G) est l'unique protéine externe du virus et intervient dans la reconnaissance des cellules cibles via des récepteurs spécifiques (p75^{NTR}, AchR, NCAM, ...) (Cf.H.1.a). C'est une protéine transmembranaire glycosylée (Sokol, Stancek et al. 1971) de 505 acides aminés découpée en trois parties : un ectodomaine de 439 acides aminés, un domaine transmembranaire de 22 acides aminés et une queue cytoplasmique de 44 acides aminés. La G a une organisation trimérique à la surface du virus (Gaudin, Ruigrok et al. 1992). Aucune donnée cristallographique n'a été obtenue concernant la glycoprotéine du virus de la rage, seule la glycoprotéine de VSV a pu être cristallisée (Cf.fig.15).

La G joue un rôle déterminant dans la reconnaissance des cellules cibles et dans l'entrée virale par la voie d'endocytose (Cf.H.1.b)

La G intervient aussi plus tard dans le cycle réplicatif, au niveau des étapes d'assemblage et de bourgeonnement où elle est essentielle dans l'identification de zones préférentielles pour le bourgeonnement. Elle y recrute, via son domaine cytoplasmique, la protéine M et induit une invagination membranaire (Mebatsion, König et al. 1996, Mebatsion, Weiland et al. 1999). Elle est responsable de la virulence et de la propagation de neurones à neurones, où la sérine 242, l'asparagine 255, la leucine 268 et surtout l'arginine 333 jouent un rôle important (Ito, Ito et al. 2010). La G est aussi impliquée dans l'induction de l'apoptose pour les souches non pathogènes de la rage (Lay, Prehaud et al. 2003, Prehaud, Lay et al. 2003).

Enfin, la G constitue l'antigène majeur du virus de la rage, avec la présence de sept sites antigéniques dont quatre ont été caractérisés : le site I (résidus 226 à 231), le site II (résidus 34 à 42 et 198 à 200), le site III (résidus 330 à 338) et G5 (résidus 254 à 275). Parmi ceux-ci, les sites II et III sont prédominants (Benmansour, Leblois et al. 1991, van der Heijden, Langedijk et al. 1993, Buthelezi, Dirr et al. 2016, Kim, Keum et al. 2017).

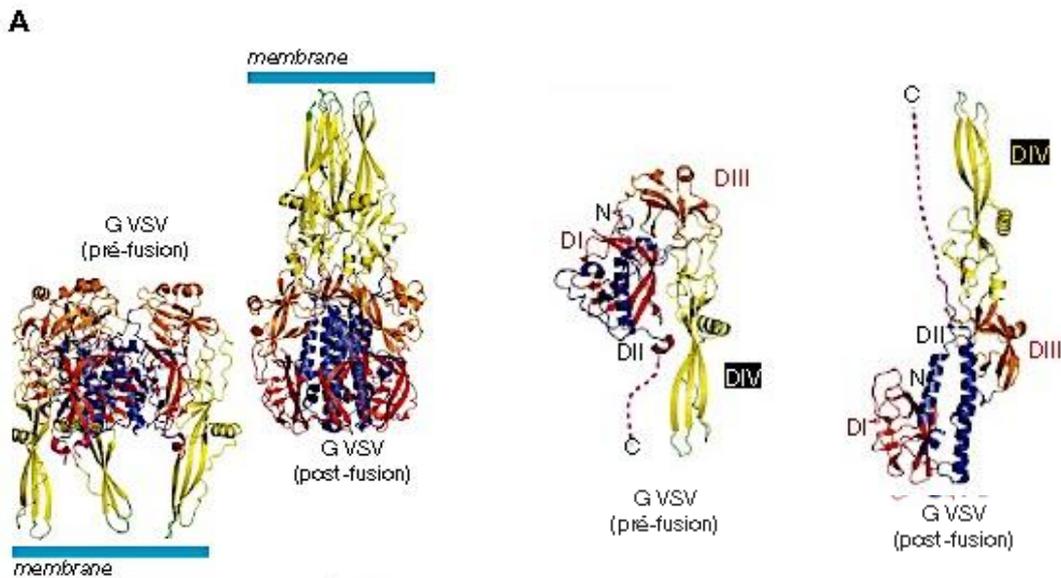


Figure 15 : Représentation des formes pré- et post-fusion de la glycoprotéine de VSV

Les domaines I à IV de la G sont de couleurs différentes, la boucle de fusion est colorée en vert et la partie C-terminale est colorée en magenta.

(Albertini, Roche et al. 2008)

5. L'ARN polymérase ARN dépendante

La polymérase du virus de la rage est la protéine dont le gène est le plus important sur le génome viral et dont les activités sont les plus centrales. Son gène couvre 60% du génome du virus, grâce à sa taille de 2142 acides aminés, ce qui lui vaut son nom de large protéine (L). D'un point de vue fonctionnel, la L porte l'ensemble des activités enzymatiques pour réaliser la transcription et la réplication du génome viral, ainsi que la polyadénylation, la pose de la coiffe et la méthylation des ARNm viraux. Bien qu'ayant ce rôle clé dans le cycle réplcatif rabique, elle est la protéine la moins exprimée, en raison de la position de son gène, la plus éloignée de l'extrémité 3' du génome. On ne dénombre qu'une cinquantaine de molécules par virion ce qui ne facilite pas son étude structurale (Thomas, Newcomb et al. 1985).

a) Structure de la L rabique

La L est une protéine extrêmement conservée chez les *Mononegavirales* où les comparaisons de séquences ont permis l'identification de six domaines conservés correspondant à des activités (Poch, Blumberg et al. 1990). Les domaines I à IV portent l'activité ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), le domaine V porte l'activité de capping et le domaine VI celui de la méthylation de la coiffe. Ces domaines sont séparés les uns des autres par des régions non conservées dites « charnières », ce qui permet l'insertion d'une séquence, codant une protéine fluorescente par exemple, sans perte substantielle d'activité (Duprex, Collins et al. 2002, Ruedas and Perrault 2009, Fix, Galloux et al. 2011). De la même façon, des expériences de co-transfection de plasmides qui codent pour des L tronquées munies d'une séquence de dimérisation pour favoriser leur interaction, montrent qu'il y a un maintien de l'activité (Dochow, Krumm et al. 2012). Cela atteste que la L des *Mononegavirales* est organisée en domaines structuraux indépendants reliés entre eux par des régions flexibles. Il est intéressant de noter que la polymérase des *Orthomyxovirus*, est tripartite avec une indépendance structurale complète des sous éléments PB1 (activité de synthèse de l'ARN), PB2 (activité de fixation de coiffes cellulaires) et PA (nucléases permettant la « capture de coiffe »). Toutefois, ces trois éléments doivent s'associer pour que les activités codées deviennent fonctionnelles.

Cette flexibilité structurale de la polymérase est primordiale pour son activité, comme le montre l'imagerie en microscopie électronique de la L de VSV (Liang, Li et al. 2015). En effet, elle adopte une conformation en forme de « 6 », avec un anneau central composé des domaines I à IV qui portent l'activité ARN polymérase ARN dépendante, et une queue sous forme de trois globules, couvrant les domaines V et VI pour l'activité de pose et de méthylation de la coiffe (Cf.fig18) (Ferrer-Orta, Arias et al. 2006, Rahmeh, Schenk et al. 2010). Il a également été décrit que la P, cofacteur de la L, joue un rôle dans l'établissement de cette conformation et dans l'optimisation du réarrangement. En effet, l'association de la P sur la L restructure la queue Cterminale qui forme alors un coude en prolongement de l'anneau, ce qui renforce sa forme en « 6 ». L'association de la P avec la L permettrait aussi : (1) la dimérisation du complexe L-P, (2) l'augmentation du taux global de synthèse d'ARN par la L et (3) l'amélioration de la processivité de la L suite au réarrangement structural provoqué par la P. Cela suggère qu'il y a une réelle coordination spatiale entre les domaines de la L tant pour leurs arrangements que pour leurs activités. Le mécanisme de synthèse de l'ARN nécessite que ce dernier passe dans l'anneau de la L afin qu'il soit polymérisé, mais à

condition qu'il soit nu. La dissociation du complexe N-ARN est réalisée par la P associé par son domaine Cterminal au complexe N-ARN alors que son extrémité Nterminale interagit avec la L tout en délivrant la N soluble (N°) qui va immédiatement encapsider le génome recopié. Les études cristallographiques du complexe N-ARN du virus de la rage, mais également du VSV et du RSV, montrent effectivement que la matrice ARN doit se dissocier de la N pour être lue par la L (Albertini, Wernimont et al. 2006, Green, Zhang et al. 2006, Tawar, Duquerroy et al. 2009)

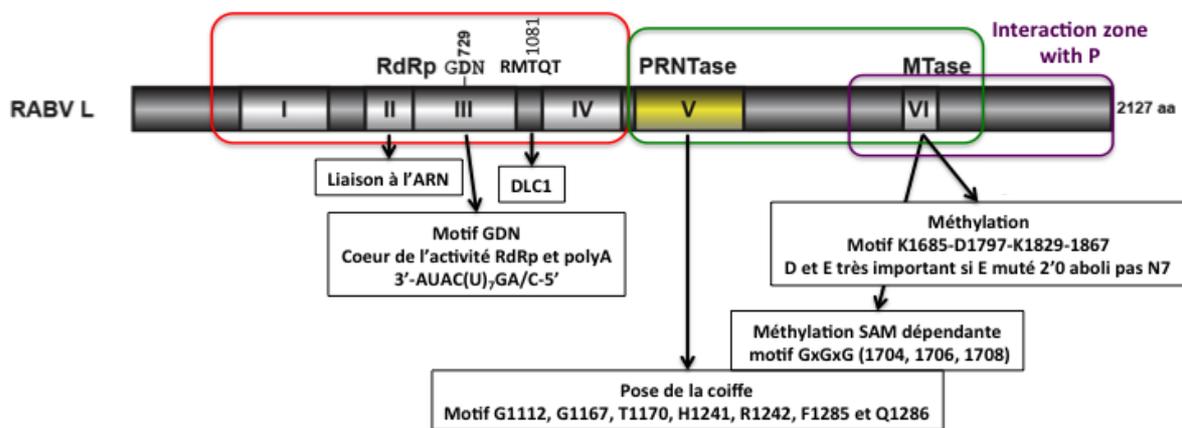


Figure 16 : Représentation schématique de la polymérase (L) du virus de la rage et de ses domaines d'activités.

D'après (Ogino, Ito et al. 2016)

b) La pose de la coiffe :

La coiffe, aussi bien pour les ARNm cellulaires que pour les ARNm viraux, assure de nombreux rôles: elle stabilise les ARNm en les protégeant des exoribonucléases 5'-3' ; elle favorise le recrutement des ribosomes par reconnaissance du facteur d'initiation eucaryotique (eIF4E) ce qui conduit à l'initiation de la traduction de l'ARNm en protéines ; elle est un marqueur du soi pour les senseurs de l'immunité innée tels que TLR, RIG-I ou MDA5 et enfin elle peut participer à l'épissage des pré-ARNm et à leur export nucléaire, ce qui n'est pas le cas pour le virus de la rage dont le transcription est cytoplasmique.

La formation de la coiffe chez les *Rhabdoviridae* se fait par un mécanisme dit « non conventionnel ». Il y a addition d'une molécule de guanosine-diphosphate (GDP) sur l'extrémité 5' de l'ARNm (Cf.fig19) et non pas d'une molécule de guanosine-monophosphate

(GMP) comme c'est le cas pour les cellules eucaryotes (Cf.fig17) (Decroly, Ferron et al. 2011).

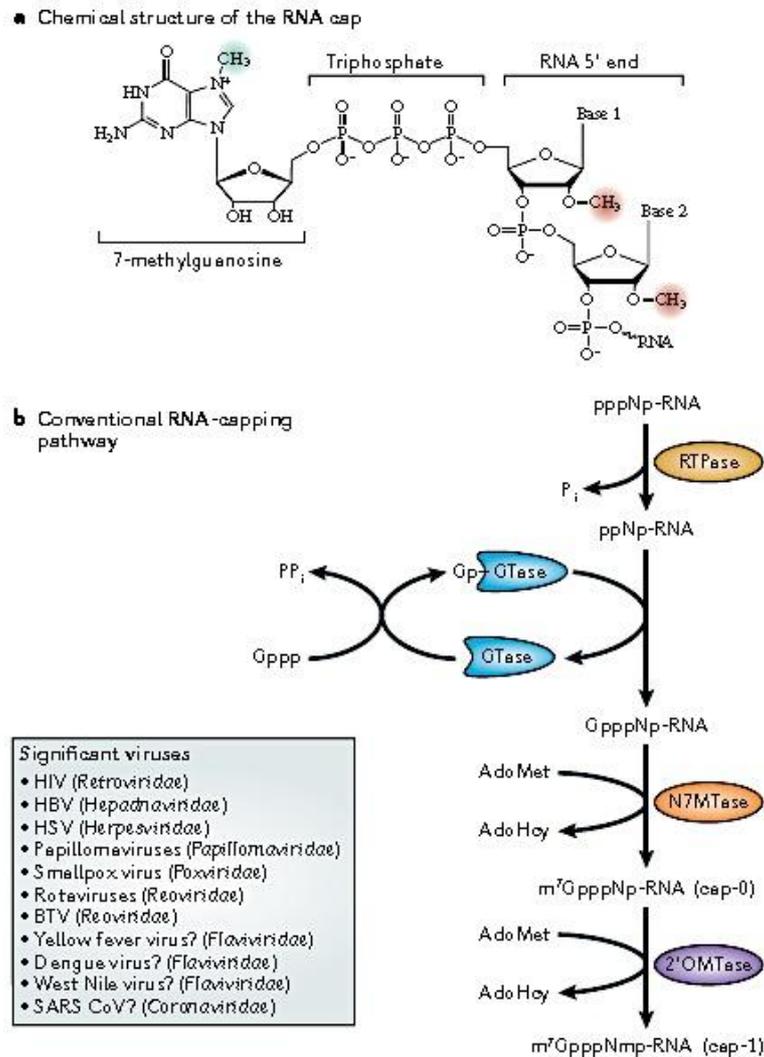


Figure 17 : (A) Représentation d'une coiffe d'ARNm. (B) Représentation du schéma conventionnel pour la pose d'une coiffe

A) La coiffe d'un ARNm est constituée d'une 7-méthylguanosine lié à l'ARNm en 5' par un pont triphosphate. Le groupe méthyle en position N7 est en vert et les groupes 2'-O-méthyle sont en rouge.

B) Le coiffage des ARNm cellulaires se fait par l'action successive de trois enzymes : l'extrémité triphosphorylée de l'ARN naissant est hydrolysée par une ARN triphosphatase (RTPase) pour donner une extrémité diphosphate. Ensuite, la guanylyltransférase (GTase) réagit avec un GTP (Gppp) pour former un intermédiaire covalent enzyme-guanylate (Gp-GTase). La molécule GMP (Gp) est transférée sur l'extrémité 5'-diphosphate de l'ARN par la GTase. La dernière étape consiste en la méthylation de la coiffe par la (guanine-N7)-méthyltransférase (N7MTase) qui transfère un groupe méthyle de la S-adénosyl-1-méthionine (AdoMet) sur la guanine de la coiffe. Cela forme la structure cap-0 et libère une S-adénosyl-1-homocystéine (AdoHcy). Enfin, la méthylation de la position ribose-2'-O du premier nucléotide par la (nucléoside-2'-O)-méthyltransférase (2'OMTase) achève le coiffage (m⁷GpppNmp-RNA).

(Decroly, Ferron et al. 2011)

Cette addition se fait grâce aux activités polyribonucléotidyltransférase (PRNTase), illustrées par deux motifs conservés GXXT-HR (G1154, T1157, H1227, R1228) (Li, Rahmeh et al. 2008, Neubauer, Ogino et al. 2016, Ogino, Ito et al. 2016), et GTP-phosphatase (GTPase) que porte le domaine V de la polymérase. L'activité PRNTase permet la formation d'un intermédiaire L-ARNm monophosphate covalent à l'extrémité 5' de l'ARN qui permet le transfert d'une molécule de GDP obtenue par l'hydrolyse d'une molécule de GTP grâce à l'activité GTPase (Cf.fig19). Cette pose de la coiffe « non conventionnelle » du virus de la rage est soumise à deux conditions : (1) la L ne coiffe que les ARNm débutant par la séquence (GS) 5'-AACGC, toute modification des trois premiers ribonucléotides entraînent un blocage du capping ; (2) la taille minimum de l'ARNm doit être de 31 nucléotides, pour que son extrémité 5' puisse atteindre le domaine PRNTase (Tekes, Rahmeh et al. 2011). Cela étant dû à l'arrangement architectural que prend la polymérase où les domaines RdRp et de capping sont physiquement distants.

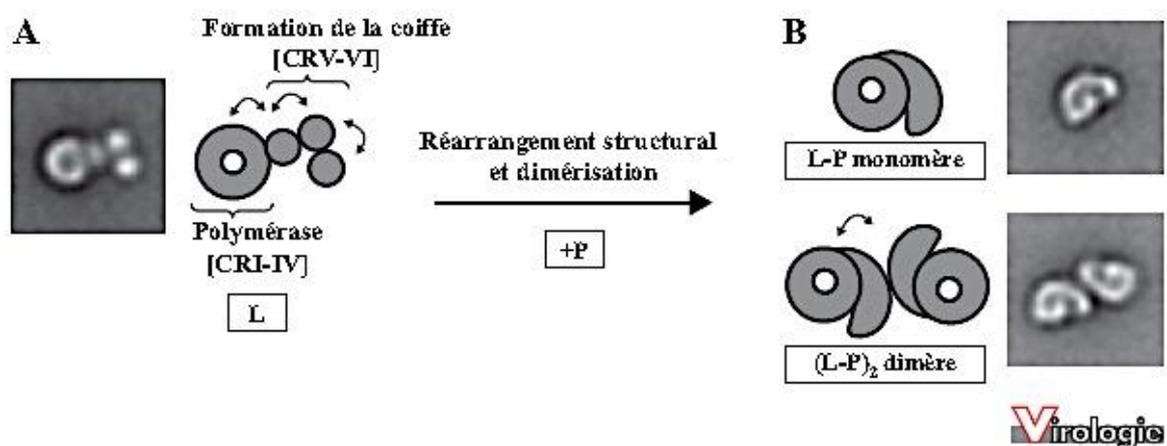


Figure 18 : Architecture moléculaire de la polymérase du VSV

A) Microscopie électronique et modèle de l'organisation de la L seule : la L adopte une conformation en forme de « 6 » avec un anneau central composé des domaines d'activités I à IV (RdRp) et une queue triglobulaire composée des domaines d'activités V et VI (pose et méthylation de la coiffe).

B) Microscopie électronique et organisation du complexe L-P : la phosphoprotéine P est le cofacteur de la polymérase L. Leur association entraîne un réarrangement structural de la L avec une rigidification de la queue permettant une meilleure processivité de la L. Cette association permet également la dimérisation du complexe L-P.

(Morin B et Whelan S.P.J. 2012)

c) Méthylation de la coiffe :

Suite à la pose de la coiffe, se met en place sa méthylation. Des études bio-informatiques ont permis d'identifier le domaine VI de la L comme étant responsable de l'activité méthyltransférase (MTase), portée par les résidus K1685, D1797, K1829 et E1867, qui forment un motif conservé parmi les *Mononegavirales* (Tian, Luo et al. 2016). Tout comme pour l'activité PRNTase, la L du virus de la rage se distingue du système eucaryote. En effet, alors que la guanine de la coiffe des ARNm cellulaires est tout d'abord méthylée en position N-7 puis en position 2'-O, ces méthylations sont réalisées dans l'ordre inverse (2'-O puis N-7) dans le cas de la polymérase rabique (Decroly, Ferron et al. 2011).

Cet enchaînement est primordial pour la bonne activité de la L, puisque la méthylation de la position 2'-O induit un changement de conformation du domaine VI de la L et permet le repositionnement de l'ARNm et l'activation de la méthylation en N-7. Il est important de noter que, tout comme pour la pose de la coiffe, la L ne méthyle que la coiffe des ARNm possédant la séquence spécifique 5'-AACGC à l'extrémité 5' (Li, Fontaine-Rodriguez et al. 2005, Ogino, Kobayashi et al. 2005, Ogino and Banerjee 2007, Li, Rahmeh et al. 2008, Ogino and Banerjee 2010).

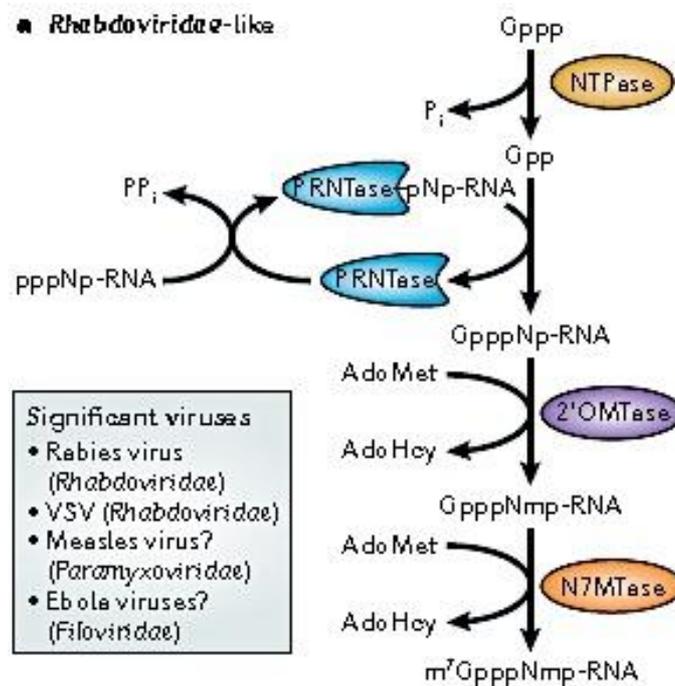


Figure 19 : Schéma des étapes de méthylation de la coiffe des ARNm des *Rhabdoviridae*

Le mécanisme de coiffage des *Rhabdoviridae* débute par l'hydrolyse d'un phosphate sur une molécule de GTP (Gppp) par la Nucléoside-triphosphatase (NTPase). La polyribonucléotidyl transférase (PRNTase) forme un intermédiaire covalent PRNTase-pNp-RNA en libérant un pyrophosphate (PPi) avec l'ARN viral naissant (pppNp-RNA : N désignant le premier nucléotide transcrit). La molécule d'ARN est ensuite transférée au GDP par la PRNTase pour donner le GpppNp-RNA. La première méthylation est réalisée par la (Nucleoside-2'-O)-méthyltransférase (2'OMTase) par transfert d'un groupe méthyle de la S-adénosyl-l-méthionine (AdoMet) sur le premier nucléotide de l'ARN. Enfin, la (guanine-N7)-méthyltransférase (N7MTase) méthyle la guanine de la coiffe pour achever le coiffage. (Decroly, Ferron et al. 2011)

La présence de plusieurs activités réalisées par la L durant la transcription implique des conditions précises d'organisation temporelle et spatiale permettant à chaque domaine d'exprimer successivement leur activité. L'hypothèse, appuyée par les récents résultats structuraux obtenus pour la L de VSV (Liang, Li et al. 2015), est que la liaison à l'ARN, sa synthèse et son détachement doivent conduire à l'alternance de réarrangements structuraux des différents domaines de la L. Des mutations à l'extrémité 3' de l'ARN génomique ou dans le domaine V de la L (pose de la coiffe), produisent des transcrits de taille anormale (40 à 400 nucléotides) dépourvus de coiffe à leur extrémité 5' (Stillman and Whitt 1999, Wang, McElvain et al. 2007, Li, Rahmeh et al. 2008). Ces résultats mettent en lumière un rôle crucial de la coiffe dans la transcription et l'élongation des ARNm. De même, un défaut de méthylation des ARNm entraînerait une augmentation de taille de la queue poly-A (Galloway and Wertz 2008, Li, Rahmeh et al. 2009).

d) Polyadénylation

Après le codon stop de chaque gène, la polymérase L rencontre la séquence « gene end » (GE) qui promeut la polyadénylation des ARNm. La séquence responsable de ce mécanisme est 3'-AUAC(U)₇GA/C-5' sur laquelle la L bégaie sur le motif (U)₇ pour conduire à la production de la queue polyadénylée.

Des études menées sur la protéine L de VSV ont montré qu'il existe un lien entre la pose de la coiffe et sa méthylation en 5', et la polyadénylation en 3' des ARNm viraux. D'une part, une inhibition du mécanisme de la pose de la coiffe entraîne une abolition de la polyadénylation (Li, Rahmeh et al. 2009). D'autre part, des mutations au niveau du site

catalytique (K1651A) du domaine VI, responsable de la méthylation de la coiffe, entraînent une hyperpolyadénylation des ARNm.

e) **Partenaires des polymérase des Mononegavirales**

Nous venons de le voir, la polymérase L joue un rôle central dans le cycle répliatif du virus de la rage. Elle y assure la transcription du génome, la polyadénylation et la pose de la coiffe des ARNm viraux ainsi que la répliation. Bien qu'elle semble assurer par elle-même ces activités, réparties sur les six domaines conservés, elle n'est totalement efficace qu'après association avec des partenaires protéiques. Ces partenaires peuvent provenir du virus lui-même. Nous avons déjà pu voir le rôle de la P dont l'association provoque une réorganisation spatiale de la L et qui intervient aussi bien dans la dislocation du complexe N-ARN que dans le recrutement de la L vers le génome. La N et la M, en fonction de leur concentration, permettent la transition de l'activité transcriptase à répliacase de la L. Cependant, il est fort probable que d'autres protéines cellulaires soient aussi nécessaires et/ou indispensables aux activités enzymatiques de la L. Pour l'heure, leur identité reste encore largement inconnue et c'est le but principal de cette thèse que d'identifier un certain nombre de ces partenaires cellulaires.

II. Partenaires cellulaires de la polymérase L du virus de la rage

L'identification de partenaires cellulaires de la rage est motivée par deux ambitions. La première est de comprendre les mécanismes mis en place par la L rabique pour sa multifonctionnalité et le détournement des systèmes cellulaires à son profit. La seconde est d'identifier des cibles cellulaires, avec un profil d'échappement inférieur à celui des protéines virales, pour l'établissement d'une nouvelle stratégie antirabique. Celle-ci pouvant être mise en place en post exposition, voire jusqu'à l'apparition des signes cliniques. En effet, une déstabilisation de la L aurait un impact direct sur le cycle viral, de par la place centrale qu'elle occupe. De plus, la conservation fonctionnelle de la L parmi les *Mononegavirales* permet d'envisager que l'exploration de la L rabique puisse aboutir à des découvertes applicables à d'autres virus dont la manipulation ou les connaissances sont moins approfondies.

L'identification des partenaires étudiés durant cette thèse a été faite en utilisant la méthode du double hybride. Cette méthode consiste à cribler une banque d'ADN complémentaires (ADNc) d'une espèce et d'un tissu spécifique (Cf.fig20). La banque qui a été utilisée est une banque de rate humaine confrontée à trois formes de la L : la L complète, un large fragment NH2-terminal (Nter) et un fragment plus court COOH-terminal (Cter). Les deux fragments ont été désignés d'après les expériences sur la L de la rougeole (Duprex, Collins et al. 2002) et du VSV (Ruedas and Perrault 2009) montrant que l'insertion d'une séquence codant la GFP entre les deux fragments (entre les domaines V et IV) ne perturbe que faiblement l'activité de la polymérase. Ceci a suggéré l'existence d'une certaine indépendance physique entre les deux fragments. Les cribler séparément peut permettre d'identifier un plus grand nombre de partenaires. En effet, la grande taille de la L totale est moins bien adaptée aux contraintes physiques liées à l'expérimentation de double hybride en levure. En outre, la fragmentation de la L offre l'avantage d'être plus précis quant à la zone d'interaction des partenaires ainsi que pour leur influence potentielle dans les différentes fonctions. Enfin, un partenaire retrouvé à la fois en interaction avec la L totale et avec un fragment de celle-ci, renforce sa pertinence et ce critère de sélection a été appliqué pour choisir les partenaires à étudier.

Le travail de criblage en double hybride a été effectué par un ancien Thésard/post-doctorant de l'Unité des Stratégies Antivirales, le Dr. Mohamed Chteoui. Il a permis l'identification de 229 partenaires cellulaires de la L rabique dont la protéine hStaufen 1.

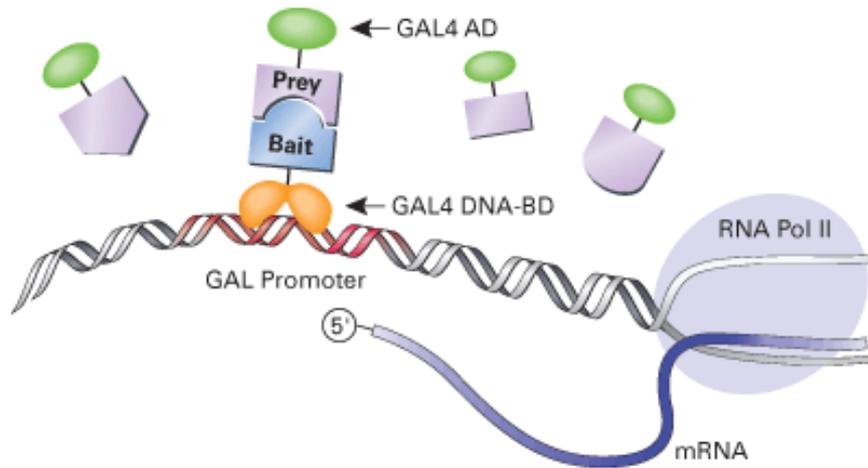


Figure 20 : Représentation schématique du principe du double hybride

Une protéine, appelée proie (Prey), est fusionnée avec le domaine d'activation de la protéine Gal4 (GAL4 AD). Une seconde protéine, appelée appât (Bait) est fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 (GAL4 BD). Si les deux protéines, proie et appât, interagissent ensemble, la protéine Gal4 est reconstituée (AD+BD) et permet la synthèse d'un gène de sélection (ici en bleu) sous contrôle du promoteur Gal (en rouge).

(Source : ozyme.fr)

A. La protéine Staufén

Lors du développement, de la drosophile (*drosophila melanogaster*), le mécanisme de compartimentalisation subcellulaire des ARNm *bicoïd*, *nanos*, *oskar* et *prospero* est enclenché. Celui-ci permet à la fois, la création d'un gradient local d'expression des protéines exprimées par ces ARNs et la mise en place d'une polarité cellulaire (Steward 1997, Schnapp 1999). Cela permet le positionnement de l'axe antéro-postérieur de l'œuf au cours de l'embryogenèse (Gavis 1997) et le développement des neuroblastes du système nerveux.

Cette compartimentalisation se fait par le biais de protéines qui reconnaissent les ARNm et les transportent vers une région subcellulaire définie. Chez la drosophile, la protéine Staufén (dStau) a été identifiée comme liant les ARNs via des *RNA Binding Domains* (RBD). Plusieurs protéines homologues ont été retrouvées chez les mammifères (Stau). L'ensemble de ces protéines Staufén présente un large spectre d'interactions avec plusieurs milliers d'ARNm qui assurent de nombreuses et diverses fonctions (St Johnston, Brown et al. 1992). Ce point illustre leur implication majeure et donc leur rôle central dans les mécanismes cellulaires (Kim, Furic et al. 2007, Furic, Maher-Laporte et al. 2008, Heraud-Farlow, Sharangdhar et al. 2013, Sugimoto, Vigilante et al. 2015).

1. dStaufen, clé du développement de la drosophile

La protéine dStaufen est extrêmement importante lors de l'embryogenèse de la drosophile (axe antéro-postérieur) (Gavis 1997).

D'un point de vue histologique, la drosophile possède un oocyte composé de cellules épithéliales somatiques. Ces dernières entourent un syncytium de seize cellules germinales parmi lesquelles quinze sont des cellules nourricières qui assurent le développement de la seizième cellule, l'oocyte (Cf.fig.21). Les cellules nourricières synthétisent plusieurs ARNm maternels qui sont ensuite transportés dans l'oocyte via le réseau microtubulaire (Nieuwburg, Nashchekin et al. 2017). Parmi ces ARNm, *Oskar* et *Bicoïd* sont pris en charge par la protéine dStaufen. L'ARNm *Oskar* est lié à et par dStaufen pour être transporté au pôle postérieur de l'œuf où il y sera traduit pour la formation de l'abdomen. Durant son transport, la traduction de l'ARNm *Oskar* est réprimée par la protéine Bruno qui reconnaît un élément cis-régulateur sur la région 3'UTR de l'ARNm. Cette répression est levée lors de la localisation de l'ARNm *Oskar* au pôle postérieur de l'oeuf (Micklem, Adams et al. 2000). De la même façon, la protéine dStaufen reconnaît l'ARNm *Bicoïd* pour le transporter au pôle antérieur de l'œuf pour le développement de la tête, où dStaufen colocalise avec l'ARNm *Bicoïd* jusqu'à ce qu'il soit traduit (St Johnston, Driever et al. 1989, Weil, Xanthakis et al. 2010). Le transport des ARNm *Oskar* et *Bicoïd* est, respectivement, kinésine et dynéine dépendant (Brendza, Serbus et al. 2000, Duncan and Warrior 2002).

Si l'ARNm *Bicoïd* se retrouve à un autre endroit de la cellule, cela conduit à la formation d'une tête ectopique. De même que la délocalisation de l'ARNm *Oskar* entraîne la formation de l'abdomen à l'endroit de l'injection de cet ARNm (Driever, Siegel et al. 1990, Lehmann and Nusslein-Volhard 1991, Wang and Lehmann 1991).

La protéine dStaufen intervient également dans le développement neuronal de la drosophile. Lors de l'embryogenèse, les neuroblastes précurseurs utilisent la division asymétrique pour produire un autre neuroblaste et une cellule mère ganglionnaire, qui donne deux neurones lors de sa division (Doe 1992). Cette division asymétrique est permise par la répartition basale-apicale de facteurs protéiques dont les protéines dStaufen, Miranda, Inscuteable et Prospero. Les protéines dStaufen et Miranda reconnaissent la région 3' UTR de l'ARNm *prospero*, et permettent sa localisation et son expression au pôle basal du neuroblaste. La protéine Prospero se retrouve dans la cellule mère ganglionnaire. Durant l'interphase, un troisième partenaire intervient, la protéine Inscuteable, qui en interagissant

avec le complexe dStaufen/Miranda, permet la localisation de l'ARNm et de la protéine Prospero au pôle apical du neuroblaste (Shen, Knoblich et al. 1998).

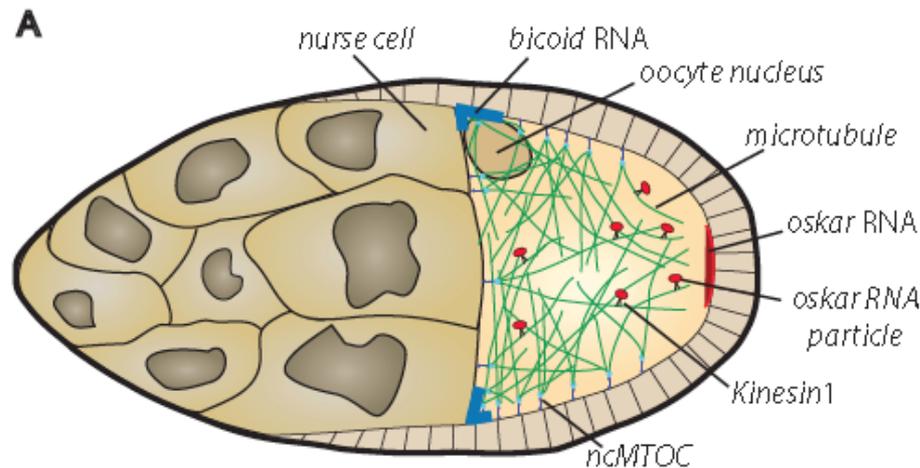


Figure 21 : Schéma de l'œuf de drosophile composé de quinze cellules nourricières et d'une cellule oocyte

L'oocyte de la drosophile est composé de quinze cellules nourricières qui fournissent l'ensemble des transcrits nécessaires au développement de la cellule oocyte. Ces transcrits sont transportés des cellules nourricières à la cellule oocyte via le réseau microtubulaire (en vert) par plusieurs moteurs cellulaires comme la kinésine. La répartition subcellulaire de ces transcrits permet la formation de l'axe antéropostérieur ou l'ARNm *Bicoid* permet la formation de la tête et l'ARNm *Oskar* la formation de l'abdomen. (Nieuwburg, Nashchekin et al. 2017)

2. La protéine Staufen chez les mammifères :

Si dStaufen est un gène maternel essentiel au développement embryonnaire de la drosophile, la protéine Staufen est très conservée à travers les espèces. Chez les mammifères, on note la présence de deux orthologues, Staufen 1 et Staufen 2 (Monshausen, Putz et al. 2001). Il existe également des protéines Staufen chez les vertébrés comme le xénope et le poisson zèbre (Ramasamy, Wang et al. 2006) et les invertébrés comme le nématode *Caenorhabditis elegans* (LeGendre, Campbell et al. 2013). Les orthologues sont probablement issus d'une duplication du gène initial présent chez la drosophile. Parmi les deux gènes identifiés chez l'Homme, celui codant hStaufen 1 se situe sur le bras court du chromosome 20 (20q 13.1) et présente une expression ubiquitaire (Kiebler, Hemraj et al. 1999, Marion, Fortes et al. 1999, Wickham, Duchaine et al. 1999). Quant au gène codant hStaufen 2, il se trouve sur le bras court du Chromosome 8 (8q 13-q21). Les protéines

hStaufen 1 et hStaufen 2 présentent 60% de similarités entre elles, contre 48,5% avec leur homologue dStaufen (Buchner, Bassi et al. 1999).

Cette similarité entre orthologues varie au niveau des domaines de liaisons à l'ARN double brin (dsRBD). Staufen 1 présente une délétion en position 5' qui lui fait perdre le dsRBD 1 de dStaufen. Staufen 2, quant à lui, perd le dsRBD 5 de dStaufen (Cf.fig22). Qu'il s'agisse de dStaufen ou des orthologues mammifères, il apparaît que le domaine dsRBD 3 est le plus efficace pour lier l'ARN. Les domaines dsRBD 1 et 4 sont moins efficaces (Wickham, Duchaine et al. 1999, Duchaine, Wang et al. 2000, Tang, Meulemans et al. 2001, Duchaine, Hemraj et al. 2002). Les domaines dsRBD2 et 5 sont incapables de lier l'ARN. Cela étant causé respectivement par l'insertion d'une séquence riche en proline et acides aminés aromatiques (Micklem, Adams et al. 2000) et par une délétion en Cter par épissage alternatif (Brizard, Luo et al. 2000). Bien qu'ils n'interagissent plus avec les ARNm, les dsRBD 2 et 5 ont été conservés au cours de l'évolution et influencent d'autres fonctions comme la localisation subcellulaire des ARNm et leur dérégulation traductionnelle *in situ* (Micklem, Adams et al. 2000). L'autre différence notable entre dStaufen et ses orthologues est la présence d'un domaine de liaison à la tubuline situé en aval du dsRBD4 uniquement sur hStaufen 1 et hStaufen 2 (Kohrmann, Luo et al. 1999, Wickham, Duchaine et al. 1999, Goetze, Tuebing et al. 2006).

Le promoteur du gène codant hStaufen 1 ne contient pas de TATA box ni de CAAT box mais est riche en G/C avec des régions SP1 et des séquences consensus pour le recrutement de facteurs de transcription trans-activateurs. Cette caractéristique est semblable à celle des gènes de ménage des mammifères et explique l'expression ubiquitaire de la protéine hStaufen 1 (Brizard, Luo et al. 2000).

La protéine hStaufen 2 est exprimée principalement au niveau neuronal (Wickham, Duchaine et al. 1999, Duchaine, Hemraj et al. 2002). Aucun mécanisme pour expliquer cette restriction n'a été décrit actuellement.

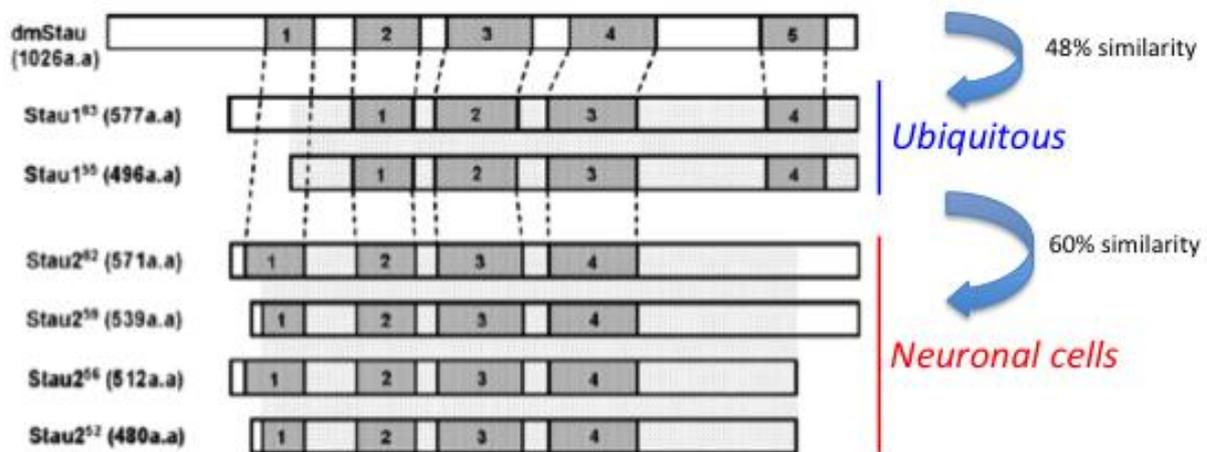


Figure 22 : Schéma de la protéine Staufen chez la drosophile (dmStau) et de ses homologues mammaliens

La protéine Staufen 1 présente deux isoformes de 63KDa et 55KDa, qui sont exprimés de façon ubiquitaire. La protéine Staufen 2 présente quatre isoformes de 62KDa, 59KDa, 56KDa et 52KDa, dont l'expression est exclusivement neuronale.

(Miki, Takano et al. 2005)

3. Organisation des gènes codant Staufen 1 et Staufen 2

Des études sur le gène humain codant la protéine hStaufen 1 montrent qu'il contient 15 exons, soit trois exons de plus que celui codant l'homologue murin, pour une taille de 65Kb (Brizard, Luo et al. 2000). De nombreux évènements d'épissages alternatifs sont responsables de la synthèse de cinq isoformes. Trois de ces transcrits présentent des variations au niveau de la longueur de la région 5'UTR mais sont équivalents en terme d'expression et codent une même protéine de 55KDa (hStau1⁵⁵). Le quatrième transcrit diffère des trois précédents par l'addition d'un exon supplémentaire en 5', responsable d'une extension peptidique en Nter donnant une protéine de 63KDa (hStau1⁶³) (Wickham, Duchaine et al. 1999). Un cinquième isoforme a été décrit plus récemment. Sa taille de 55KDa avec une insertion de 18 nucléotides dans le domaine dsRBD 3 conduit à l'incapacité de la protéine à lier l'ARN double brin. Cette protéine est exprimée de façon tissu-dépendant dans le cœur, le foie, les reins ou encore le pancréas (Fa-Hui, Hai-Feng et al. 2008). Bien qu'aucune fonction spécifique ne lui soit attribuée, elle semble être fonctionnelle puisque des équivalents sont présents chez la souris et le rat (Duchaine, Wang et al. 2000, Monshausen, Putz et al. 2001). De la même façon, hStaufen 2 présente plusieurs isoformes de masses différentes : hStau2⁵², hStau2⁵⁶, hStau2⁵⁹ et hStau2⁶², divergentes sur leurs extrémités Nter et Cter. Bien que l'idée

d'une spécialisation fonctionnelle de chaque transcrit soit envisageable, aucun travaux ne permet de l'affirmer.

4. Domaines de liaison à l'ARN

Il existe un grand nombre de protéines liant les ARNs (RBP : RNA Binding Protein) qui utilisent différents domaines de liaison à l'ARN (RBD : RNA Binding Domain) : les motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM), les domaines d'homologie K (KH domain), les doigts de zinc (Zinc finger), les domaines Dead-box ou encore des domaines de liaison à l'ARN double brin (dsRBD). La protéine Staufen utilise ce dernier pour se lier aux ARNm dont elle a la charge comme l'ARNm *Bicoid* et *Oskar* chez la drosophile ou ARF1 chez les mammifères. Les dsRBD sont des domaines de 65 à 68 acides aminés à motifs variables organisés en hélices α et feuilletts β . Les premiers à avoir été identifiés, par résonance magnétique nucléaire (RMN), sont le dsRBD la RNase III de *Escherichia Coli* et le dsRBD3 de dStaufen (Bycroft, Grunert et al. 1995, Kharrat, Macias et al. 1995).

5. Séquences reconnues par Staufen et mécanisme d'interaction

Le mécanisme mis en place par la protéine Staufen pour interagir avec ses différents ARNm cibles est une reconnaissance de séquences qui forment des structures tige-boucles particulières. La mieux caractérisée est celle située à l'extrémité 3' de l'ARNm *Bicoid* appelée « upstream terminal repeat » (3'UTR). Cette structure, de 625 bases, contient plusieurs séquences répétées inversement complémentaires et est indispensable pour la localisation de l'ARNm *Bicoid* au pôle antérieur durant l'embryogénèse de la drosophile (Macdonald and Struhl 1988, Macdonald, Kerr et al. 1993) (Cf.fig23). Plusieurs analyses mutationnelles ont permis d'identifier les régions minimales responsables de l'interaction avec Staufen, qui sont les tiges III, IV et V (Ferrandon, Elphick et al. 1994). Cependant cette identification ne permet de comprendre complètement le mécanisme d'interaction, puisque d'autres ARNm portant cette structure ne sont pas capables de recruter et d'interagir avec Staufen (St Johnston, Brown et al. 1992).

L'élément clé de la fixation de Staufen sur les ARNm est la structure secondaire, notamment de la tige III. Cette reconnaissance permet la formation de larges granules ribonucléoprotéiques dans l'oocyte de la drosophile (Ferrandon, Koch et al. 1997). La tige V

porte un signal de fixation et un signal de localisation, partagé avec la tige IV, pour la localisation au pôle antérieur de l'œuf (Macdonald and Kerr 1997). De la même façon, chez les mammifères, Staufen reconnaît une structure tige boucle en 3' de l'ARNm ARF1 (ADP-ribosylation factor 1), requis pour le transport golgien (Kim, Furic et al. 2005, Kim, Furic et al. 2007). La fixation de Staufen sur l'extrémité 5' de l'ARNm TAR du VIH requiert également une structure secondaire en tige boucle (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005).

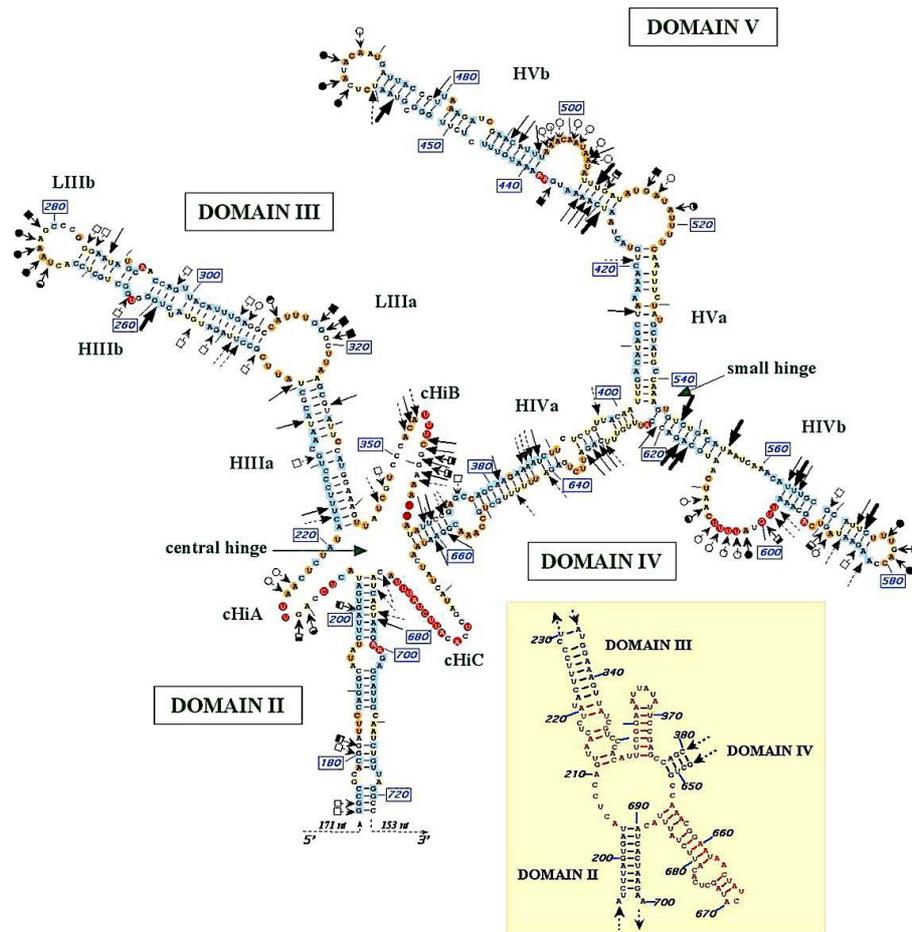


Figure 23 : Modèle de la structure secondaire de la région 3'UTR de l'ARNm Bicoïd (Brunel and Ehresmann 2004)

6. Localisation subcellulaire de la protéine hStaufen 1

La protéine hStaufen 1 a une expression ubiquitaire, contrairement à son homologue la protéine hStaufen 2 exprimée uniquement dans les cellules neuronales. Cette expression s'explique par les multiples rôles de hStaufen 1 dans les mécanismes de régulation d'ARNm. La protéine hStaufen 1 se trouve principalement dans le cytoplasme des cellules notamment au niveau périnucléaire et au niveau du réticulum endoplasmique (Marion, Fortes et al. 1999, Wickham, Duchaine et al. 1999). Dans les neurones, la protéine hStaufen 1 est localisée dans le corps cellulaire et les dendrites, elle n'est pas présente dans les axones. Cela sous entend que hStaufen 1 intervient dans le transport de complexes RNP cellulaires, qui lui sont associés, et dans leur localisation à proximité du réticulum endoplasmique. On peut observer hStaufen 1 dans des granules tout le long des dendrites, les plus petites sont des granules de transports et les plus grosses contiennent des ribosomes (Kohrmann, Luo et al. 1999).

La protéine hStaufen 1 présente un signal d'import nucléaire (NES), fonctionnel chez la levure (Martel, Macchi et al. 2006). Ce signal se chevauche avec celui de rétention cytoplasmique et permet à hStaufen 1 de transiter entre le cytoplasme et le noyau pour se loger dans le nucléole (Le, Sternglanz et al. 2000). La protéine hStaufen 1 pourrait de ce fait être responsable du transport d'ARNm ciblés du noyau vers leur site de traduction et donc assurer la formation de certains complexes RNPs (Le, Sternglanz et al. 2000).

7. Staufen et le développement chez les mammifères

Comme nous l'avons vu pour la drosophile, la protéine Staufen 1 joue un grand rôle dans le développement chez les mammifères. Chez la souris, mStaufen 1 intervient dans la différenciation des cellules embryonnaires pluripotentes notamment dans les étapes précoces (Gautrey, McConnell et al. 2008). Leur lignée épithéliale gastrique est enrichie en transcrits codant la protéine mStaufen 1 (Mills, Andersson et al. 2002), ainsi que les cellules squelettiques C2C12 lors de leur différenciation en myotubes (Belanger, Stocksley et al. 2003). Cette augmentation permet une meilleure activité des voies de dégradation dans lesquelles est impliquée mStaufen 1 (Kim, Furic et al. 2007).

Au niveau neuronal, la protéine mStaufen 1, tout comme la protéine mStaufen 2, intervient sur la plasticité des neurones. *In vivo*, le Knock Out de mStaufen 1 dans les neurones de souris entraîne un défaut de morphogénèse avec une réduction significative de

l'arborescence et de la taille des dendrites, et une diminution du transport des ARNm le long des dendrites. La déplétion de mStaufen 1 entraîne aussi un déficit du transport dendritique et une altération de la mémoire ce qui conduit à une forme tardive de potentialisation synaptique à long terme (Lebeau, Maher-Laporte et al. 2008). En revanche, le développement, la fertilité, la morphologie cérébrale et le comportement des souris ne sont pas altérés. Bien que les mêmes observations soient faites pour une déplétion de mStaufen 2 par shRNA, les fonctions altérées sont différentes, notamment en ce qui concerne la mémoire avec une dépression à long terme synaptique (Lebeau, Miller et al. 2011). De plus, la déplétion de la protéine mStaufen 1 n'entraîne pas d'augmentation d'expression de la protéine mStaufen 2, ce qui laisse à penser que ces deux protéines ont des rôles différents, sans compensation fonctionnelle (Vessey, Macchi et al. 2008).

8. Staufen et le transport des ARNs

La protéine Staufen 1 des mammifères colocalise avec des structures subcellulaires liées aux ARNs et au cytosquelette comme le réticulum endoplasmique, les polysomes et le réseau microtubulaire (Kiebler, Hemraj et al. 1999, Marion, Fortes et al. 1999, Wickham, Duchaine et al. 1999). Staufen 1 interagit aussi avec certains composants des polysomes et des sous-unités du ribosome (Villace, Marion et al. 2004). L'ensemble de ces interactions fait intervenir différents domaines, dsRBD3, dsRBD4, TBD de Staufen.

Le rôle de Staufen dans le transport se fait principalement au niveau neuronal où l'acheminement spécifique d'ARNm au niveau synaptique permet de créer des domaines différenciés importants pour la production de neurotransmetteurs, l'établissement de la mémoire et la plasticité neuronale (Steward 1997, Tiedge, Bloom et al. 1999, Kiebler and DesGroseillers 2000). Ce transport est microtubule dépendant puisqu'un traitement au nocodazole, qui a pour effet de dépolymériser les microtubules, enrichit la fraction cytoplasmique en Staufen et l'appauvrit dans les granules (Kohrmann, Luo et al. 1999). En effet, les ARNs sont transportés en association avec de larges complexes ribonucléoprotéiques pour les maintenir dans un état quiescent. Cet état est levé en réponse à un stimulus synaptique, qui permet leur dissociation du complexe et leur traduction. Ce transport implique probablement le *Tubulin Binding Domain (TDB)* mais d'autres éléments du cytosquelette jouent un rôle comme l'actine, l'internexine ou la protéine Tau ainsi que des moteurs cellulaires comme la dynéine, la kinésine et la myosine (Villace, Marion et al. 2004). Les

deux sens de transport sont observés, rétrograde (dynéine), de l'extrémité neuronale au corps cellulaire, et antérograde (kinésine), du corps cellulaire vers l'extrémité neuronale, à une vitesse de 6,4µm/min.

9. La protéine Staufen 1 et la régulation traductionnelle

Depuis sa découverte, l'étude de la protéine dStaufen a démontré ses nombreux rôles dans la régulation traductionnelle des ARNm qui nécessitent l'association de la protéine dStaufen aux complexes ribonucléoprotéiques. De même, l'homologue mammalien hStaufen 1 est associé à de nombreux ARNm., par exemple à 7% des transcrits totaux des cellules HEK293T par immunoprécipitation (Furic, Maher-Laporte et al. 2008). La diminution d'expression de hStaufen 1 par siRNA conduit à l'augmentation de l'expression d'1,1% des transcrits totaux (Kim, Furic et al. 2007). Des résultats d'immunoprécipitation et de sédimentation sur gradient de saccharose montrent aussi une association de hStaufen 1 avec des ARN ribosomiaux et des protéines associées aux ribosomes, ainsi qu'avec les polysomes (Marion, Fortes et al. 1999, Luo, Duchaine et al. 2002, Villace, Marion et al. 2004, Ricci, Kucukural et al. 2014).

Chez la drosophile, l'association de l'ARNm *Oskar* avec la protéine dStaufen permet son transport et sa répression traductionnelle jusqu'au pôle postérieur de l'œuf. Une fois le site d'expression atteint, la répression traductionnelle de l'ARNm est levée pour permettre sa synthèse in situ. La protéine dStaufen jouerait donc un rôle dans cette dérégulation, régulée par le domaine dsRBD5. L'absence de ce domaine n'affecte pas la liaison avec l'ARNm *Oskar* mais sa synthèse n'est plus activée.

Afin de définir si l'homologue humain de dStaufen, la protéine hStaufen 1, présente un rôle similaire, des études ont été menées sur le transcrit TAR du VIH-1. Le recrutement de la machinerie traductionnelle se fait par reconnaissance de structures tige-boucles stables en position 5'UTR comme celles présentes sur l'ARNm *TAR*. Le clonage de ce site en amont d'un ARNm rapporteur, ainsi que le site SBS (*Staufen Binding Site*) 3'UTR de l'ARNm *Arf-1* comme contrôle, révèle un lien entre le taux de traduction du rapporteur et le niveau d'expression de la protéine hStaufen 1 (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005). Plus récemment, une étude réalisée avec la méthode hiCLIP a permis de localiser les SBS de hStaufen 1 sur plus de 4000 ARNs, avec une augmentation de la synthèse protéique des transcrits ayant un SBS dans leur région codante (Sugimoto, Vigilante et al. 2015)

10. La protéine Staufen 1 et la dégradation

La protéine Staufen 1 interagit avec de nombreux ARNm dont les fonctions sont très diverses (Furic, Maher-Laporte et al. 2008). Cette capacité de liaison spécifique aux ARNs ont poussé les chercheurs à investiguer le rôle que Staufen 1 pouvait exercer sur ces ARNm. C'est en 2005, qu'une équipe décrit pour la première fois un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle influençant la traduction des ARNm et impliquant la protéine Staufen 1 (Kim, Furic et al. 2005). Les études par double hybride ont montré que les domaines dsRBD4-TBD de la protéine Staufen 1 interagissent avec la protéine à activité hélicase UPF1. L'ARN ciblé est déstabilisé par la fixation de Staufen 1 sur un site SBS 3'UTR situé suffisamment en aval du codon stop. Un mécanisme similaire de dégradation des ARNm ayant déjà été décrit, le « *Nonsense-mediated mRNA decay* » (NMD), les chercheurs ont proposé que Staufen soit un composant d'un « *Staufen 1 mediated mRNA decay* » (SMD). Le recrutement, par ces deux mécanismes, de l'hélicase UPF1, crée une compétition où l'efficacité d'une voie influence celle de l'autre (Gong, Kim et al. 2009) (Cf.fig.24).

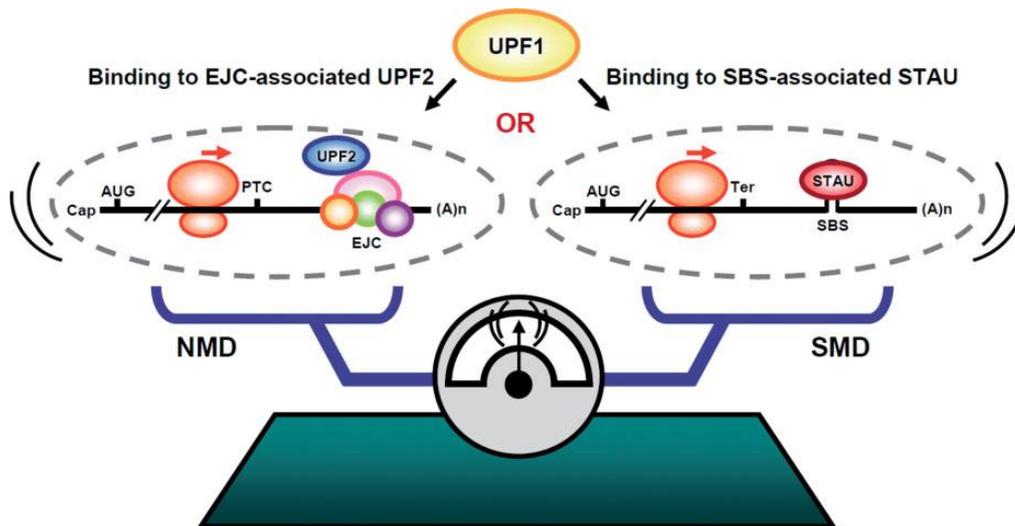


Figure 24 : Modèle compétitif entre les mécanismes Staufen1 mediated mRNA decay (SMD) et Nonsense mediated mRNA decay (NMD)

La voie NMD se déclenche lors d'un arrêt de la traduction en amont du complexe de jonction exon-exon (EJC) et recrutement des facteurs UPF2 et UPF3. La voie SMD se déclenche par la fixation de la protéine Staufen 1 sur son SBS. Ces deux voies recrutent le facteur UPF1 pour lequel elles sont en compétition. (Park and Maquat 2013)

Les mécanismes mis en jeu dans ces deux voies sont toutefois assez distincts. Tandis que le mécanisme NMD fait intervenir des complexes de jonctions d'exons (EJC) et les facteurs UPF2 et UPF3 (Singh, Jakob et al. 2007), le mécanisme SMD ne nécessite que la fixation de Staufen 1 sur son site SBS (Kim, Furic et al. 2007). L'autre différence est la nature de la cible. En effet, le mécanisme SMD ne régule pas seulement l'expression d'ARNm aberrant, comme le fait le mécanisme NMD, mais aussi l'expression de gènes traduits correctement, à condition qu'ils possèdent un site SBS 3'UTR.

Le site de liaison de la protéine Staufen 1 n'est pas une séquence spécifique mais un motif ARN double brin particulier. Il s'agit d'un appariement intramoléculaire soit entre deux séquences conduisant à la formation d'une structure tige-boucle, soit entre l'ARNm cible et un ARN non-codant (Cf. fig.25). Ce dernier mécanisme se base sur des séquences hautement répétées du génome telles que les séquences Alu (Gong and Maquat 2011). Le SBS le mieux décrit est celui de l'ARNm codant le facteur 1 d'ADP-ribosylation (ARF1), qui est une structure tige boucle de 19 paires de bases (Kim, Furic et al. 2007).

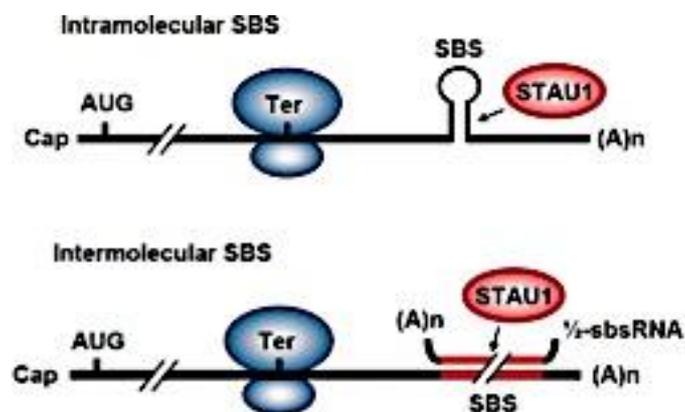


Figure 25 : Représentation des deux mécanismes de reconnaissance des SBS par la protéine Staufen 1

La formation d'un SBS peut se faire de façon intramoléculaire via des séquences complémentaires portées par un même ARN. Elle peut également se faire de façon intermoléculaire par la formation d'une structure double brin via des séquences complémentaires portées par deux ARNs.

(Park and Maquat 2013)

11. La protéine Staufen et le stress cellulaire

Lors d'un stress cellulaire (choc thermique ou oxydant, irradiation UV ou pathogène (Kedersha, Gupta et al. 1999), l'expression d'une majorité de gènes est réprimée pour n'exprimer que ceux spécifiques à la réponse au stress, par économie d'énergie. Cette répression traductionnelle comporte deux voies. La première est celle de la dégradation des transcrits (Cf.II.A.10). La deuxième est celle du stockage des ARNm non pertinents dans des granules cytoplasmiques induits par le stress. Ces granules sont de deux types : les « *processing bodies* » (P-Bodies) et les granules de stress (GS).

La formation des P-Bodies est dépendante de la présence d'ARNm non traduits. Ils sont présents dans des cellules non-stressées mais leur nombre augmente lors d'un stress cellulaire (Teixeira, Sheth et al. 2005). Leur rôle est de réprimer et/ou de dégrader les ARNm piégés en association avec plusieurs facteurs de dégradation, des acteurs du NMD (voir ci-dessus) ainsi que le facteur d'initiation eIF4E sous forme réprimée. Cependant, les ARNm peuvent quitter ces structures sans être dégradés et former de nouveaux polysomes (Bregues, Teixeira et al. 2005).

Les GS se forment en réponse à une initiation traductionnelle défectueuse induite par un stress. En terme de cinétique, les GS sont formés après les P-Bodies, mais les deux structures peuvent s'associer (Cf.fig26) (Buchan and Parker 2009). La sous-unité eIF2 α est le principal régulateur de la formation des GS. Sa phosphorylation par diverses kinases, dépendante de la nature du stress, conduit à l'arrêt global de la traduction et à la formation des GS. Ces derniers interagissent avec de nombreux composés de la machinerie de pré-initiation et de traduction (Kedersha and Anderson 2002), ainsi qu'avec des protéines se liant aux ARNs telles que les protéines *T-cell intracellular antigen-1* (TIA-1), *TIA-1 related protein* (TIAR) et *Ras-GAP SH3 binding protein* (G3BP). Ces trois protéines sont indispensables pour la formation des GS.

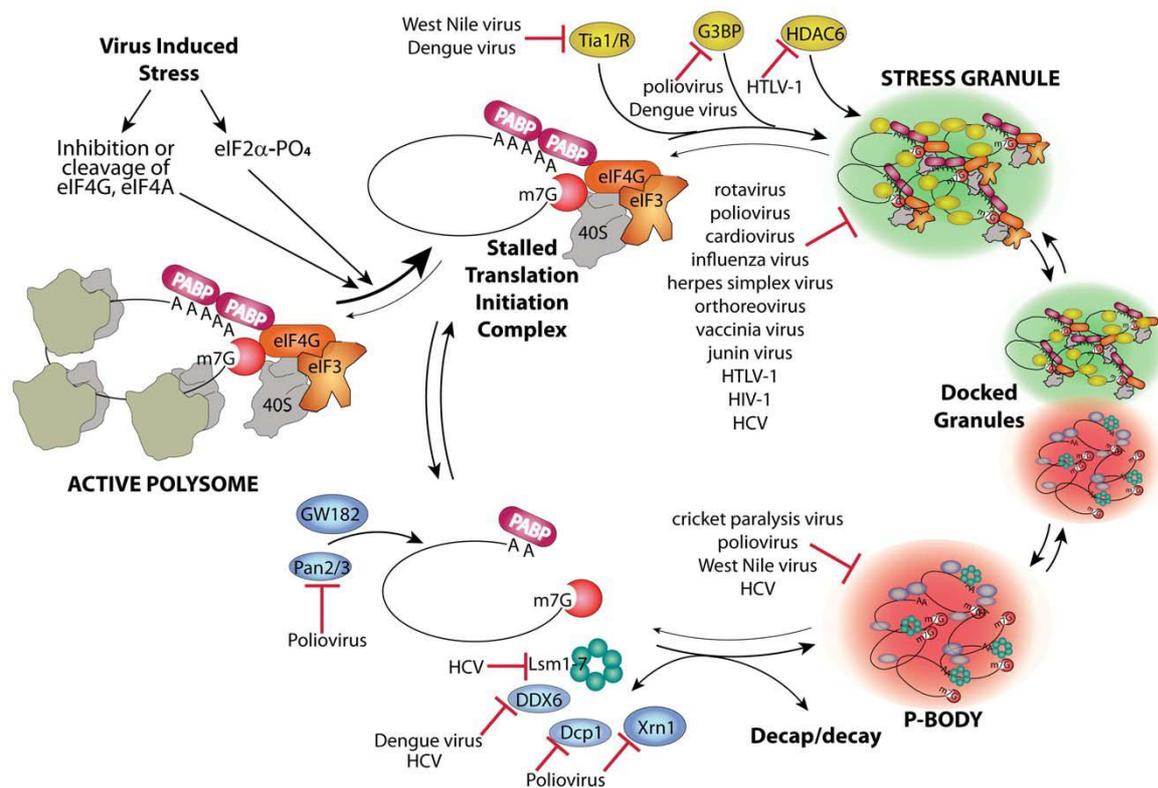


Figure 26 : Schéma de l'assemblage des Granules de Stress et des P-Bodies, et interférences par les virus

Le stress cellulaire viral induit le blocage du complexe de transcription et à la formation de granules de stress par recrutement microtubule dépendant de marqueurs de granules de stress tels que Tia1/R, G3BP et HDAC6 et des complexes d'initiation. Parallèlement, le complexe d'initiation peut être débarrassé des facteurs d'initiation et des sous-unités ribosomiques pour être concentré dans les P-bodies. Ces structures peuvent interagir avec les granules de stress. Les différentes étapes durant lesquelles les virus peuvent interférer dans l'établissement de ces deux voies sont indiquées.

(Lloyd 2012)

Il a été décrit que la protéine Staufen 1 joue un rôle dans la survie cellulaire suite à un stress. En effet, elle est retrouvée dans les GS suite à un stress, en revanche elle n'est pas ou très peu présente dans les P-Bodies (Thomas, Martinez Tosar et al. 2005, Thomas, Martinez Tosar et al. 2009). Il semble que Staufen 1 soit principalement associée au polysome afin de les maintenir traductionnellement actif, et sa présence dans les GS ne résulterait que du démantèlement des polysomes lors du stress. Toutefois, Staufen 1 semble inhiber la formation des GS. En effet, sa déplétion conduit à leur augmentation tandis que sa surexpression inhibe leur formation. La protéine Staufen 1 pourrait aussi intervenir dans le mécanisme de désassemblage des GS. Après un stress, les ARNm contenus dans les GS sont progressivement remis dans un stade polysome où l'initiation traductionnelle et la synthèse

protéique reprennent. La protéine Staufen 1 favorise ce passage en stabilisant les ARNs dans un état polysome (Thomas, Martinez Tosar et al. 2009).

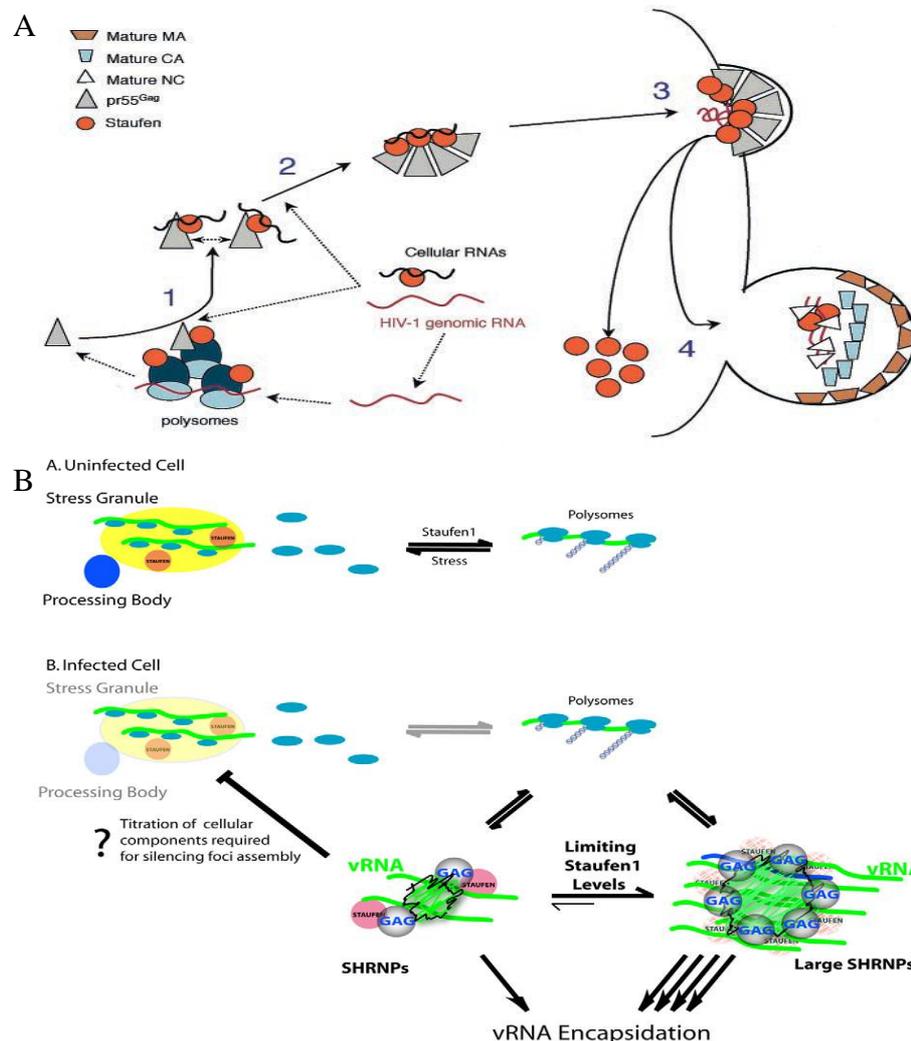
De nombreux résultats montrent que les virus détournent les composants des GS pour bloquer leur formation ou au contraire pour les utiliser favorablement. C'est le cas du VIH-1 qui, par le biais de son précurseur pr⁵⁵GAG, interagit avec hStaufen 1 pour bloquer la formation des GS et favoriser l'encapsidation et la production de particules virales (Abrahamyan, Chatel-Chaix et al. 2010).

12. La protéine Staufen 1 et les virus

a) Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

Etant donné les nombreux rôles que la protéine Staufen 1 joue dans la cellule, il était important d'envisager que les virus soient susceptibles de la détourner à leur avantage. C'est le cas des rétrovirus comme le VIH-1, le VIH-2 et le virus de la leucémie murine Moloney (MLV). La protéine hStaufen 1, grâce aux domaines dsRBD, interagit avec l'ARN génomique de ces virus durant le cycle répliatif mais également dans le virion, où hStaufen 1 est encapsidée (Mouland, Mercier et al. 2000). La quantité de protéine hStaufen 1 présente dans le virion est proportionnelle à la quantité d'ARN viral encapsidé. Une surexpression de hStaufen 1 dans la cellule a pour effet d'augmenter l'encapsidation du génome viral mais aussi de diminuer le pouvoir infectieux des particules néosynthétisées. Le domaine dsDRB3 de hStaufen 1 interagit avec l'extrémité C-terminale du précurseur pr⁵⁵GAG au niveau d'un domaine en doigt de zinc (Chatel-Chaix, Clement et al. 2004, Chatel-Chaix, Abrahamyan et al. 2007, Chatel-Chaix, Boulay et al. 2008). Le domaine dsDRB3 de hStaufen 1 est également impliqué dans l'interaction avec l'ARN génomique du HIV mais pas avec les ARNm viraux. Ces interactions ont deux conséquences. La première est d'améliorer l'assemblage des néoparticules et l'encapsidation du génome viral pour lesquelles le précurseur pr⁵⁵GAG est requis (Chatel-Chaix, Abrahamyan et al. 2007, Milev, Brown et al. 2010). Durant ces étapes, les acides aminés en position 26 à 37 en N-terminal de hStaufen 1 favorisent la multimérisation de pr⁵⁵GAG et recrutent diverses protéines nécessaires au bourgeonnement (Chatel-Chaix, Boulay et al. 2008). Le précurseur pr⁵⁵GAG quant à lui, recrute hStaufen 1 à la membrane plasmique, au niveau de radeaux lipidiques riches en cholestérol et en ganglioside 1. La protéine hStaufen 1 et le précurseur pr⁵⁵GAG peuvent alors recruter l'ARN génomique. La seconde conséquence est la formation de granules, appelés *Staufen 1 RNP* (SHRNP) où

sont complexés la protéine hStaufen 1, le précurseur pr⁵⁵GAG et l'ARN génomique (Abrahamyan, Chatel-Chaix et al. 2010).



D'autres études ont montré un rôle de hStaufen 1 dans le cycle réplcatif du virus *Influenza*. La protéine NS1 est une protéine accessoire du virus de la grippe qui intervient dans des étapes tardives de synthèse protéique et de morphogénèse virale. NS1 présente une capacité interactive tant au niveau des protéines virales que des protéines cellulaires, ce qui lui permet notamment de réguler la réponse immunitaire innée (Hsu 2018). Parmi ces protéines cellulaires se trouve la protéine hStaufen 1. Cette interaction a été validée par double hybride, co-immunoprécipitation et immunofluorescence au niveau des polysomes (Falcon, Fortes et al. 1999). Tout comme pour le VIH, hStaufen 1 semble jouer un rôle au niveau de la production de néoparticules, où la diminution d'expression de hStaufen 1 conduit à une plus faible production virale et un bourgeonnement affaibli (de Lucas, Peredo et al. 2010). Cependant, aucun effet sur l'expression et le transport nucléo-cytoplasmique n'est observé. Les interactions de hStaufen 1 dans le cadre d'une infection *influenza* ne se limitent pas seulement à la protéine NS1. La nucléoprotéine NP, la sous-unité PA de la polymérase, ainsi que les ARNm viraux sont décrits comme interagissant avec la protéine hStaufen 1 (de Lucas, Peredo et al. 2010). L'ensemble de ces éléments laisse penser que la protéine hStaufen 1 a un rôle dans l'étape tardive d'assemblage du virus.

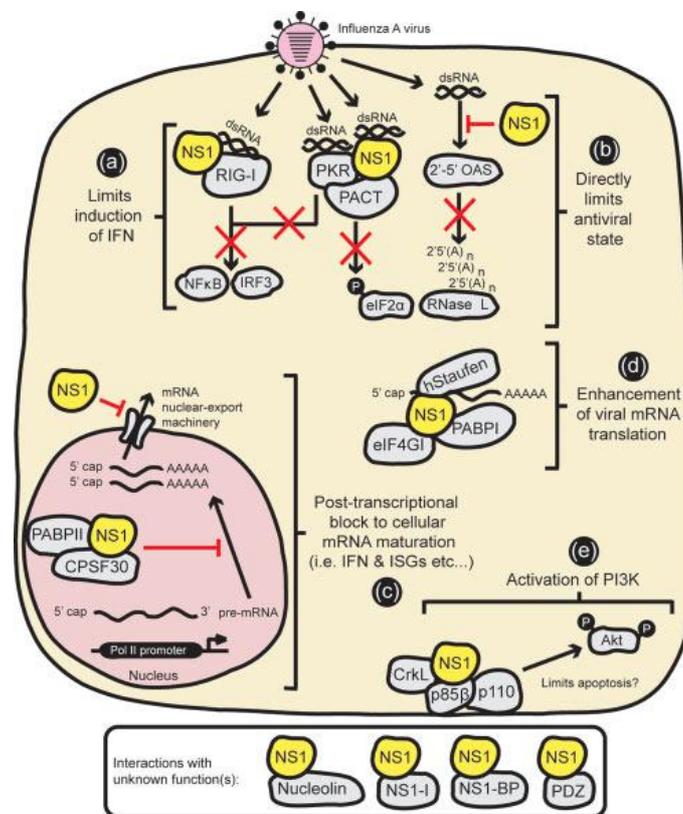


Figure 28 : Rôle de la protéine NS1 dans le cycle réplcatif du virus *Influenza* et détournement de la protéine hStaufen 1. (Hale, Randall et al. 2008)

Objectif du travail de thèse

La rage est une des plus anciennes maladies connue de l'Homme. Malgré les nombreuses connaissances fondamentales accumulées sur son agent étiologique et la pathologie provoquée, malgré un vaccin très efficace, aussi bien en pré-exposition qu'en post-exposition avant l'apparition des premiers signes de la maladie, le virus de la rage est encore responsable de 60 000 morts dans le monde chaque année. Ce chiffre est probablement sous estimé selon l'OMS et concerne principalement les pays en développement d'Asie et d'Afrique, où l'accès à un centre de santé compétent et donc à un traitement peuvent être difficile. Au delà de cette insuffisante couverture vaccinale, aucun traitement n'est aujourd'hui disponible après l'apparition des premiers signes de la maladie (dépression, douleur au niveau du site d'inoculation, fièvre, maux de tête, nausées, ...) lorsque le virus a déjà atteint le système nerveux central.

La mise en place d'une stratégie antirabique post-exposition repose sur deux axes de recherches : (1) le criblage *in vitro* de petites molécules chimiques afin de trouver des composés antiviraux actifs (*leads*) que les chimistes peuvent ensuite optimiser, (2) l'accumulation de connaissances sur la mise en place de l'infection et les voies et/ou les protéines cellulaires détournées par le virus dans le but de mettre en place des stratégies antivirales spécifiquement ciblées. Ces deux axes sont explorés au sein de l'Unité des Stratégies Antivirales (USA) où j'ai effectué mon travail de thèse. Celui-ci porte sur l'identification de partenaires cellulaires de la polymérase du virus de la rage qui, en tant que protéine la plus conservée et la plus multifonctionnelle du complexe de réplication, représente une cible de choix pour déstabiliser le complexe RNP et la mécanique du virus.

En effet, le virus de la rage exprime cinq protéines (N, P, M, G et L) toutes nécessaires pour la réalisation de son cycle cellulaire. L'une des plus importantes est la polymérase (L) qui assure les activités de transcription, incluant la pose de la coiffe et la polyadénylation des ARNm viraux, ainsi que la réplication du génome viral. Peu de données précises sont publiées sur les bases structurales et la mise en place de ces activités et encore moins sur le rôle que pourraient jouer les partenaires cellulaires. D'autre part, la polymérase est très conservée entre les *Lyssavirus* mais aussi les *Rhabdovirus* et au-delà parmi les *Mononegavirales*. Elle constitue une cible unique pour le développement d'antiviraux à large spectre. C'est dans cet optique que l'USA a réalisé un crible en double hybride de la polymérase rabique contre une banque d'ADNc de rate humaine afin d'identifier des protéines cellulaires indispensables

pour la réalisation de l'ensemble de ses fonctions. En effet, la déstabilisation d'interactions virus-cellule indispensables au cycle viral, est non seulement un élément prometteur pour la mise en place d'un traitement antirabique, mais promet d'être une stratégie moins versatile que de cibler exclusivement les protéines virales, beaucoup plus sujettes au mutants d'échappement.

Je me suis intéressé à la protéine hStaufen 1, identifiée dans un crible double hybride comme partenaire de la L rabique. Si l'identification originale du partenaire « hStaufen 1 » a été réalisée par un précédent Thésard de l'USA, le Docteur Mohamed Ben Mechlia, mon travail a consisté à poursuivre l'exploration fonctionnelle de cette interaction. A cette fin, j'ai développé des vecteurs lentiviraux portant des shRNAs contre la protéine hStaufen 1 afin de diminuer son expression et étudier son rôle dans le cycle répliatif du virus de la rage. D'une part, j'ai cherché à déterminer l'importance de cette protéine dans différentes étapes du cycle répliatif rabique. Enfin, j'ai étudié les voies biologiques dans lesquelles la protéine hStaufen 1 est impliquée et qui pourraient être détournées par le virus à son profit, dans l'objectif de caractériser des axes potentiels de stratégie antivirale.

Dans un second temps, j'ai repris l'analyse du crible double hybride initial afin d'y identifier d'autres protéines cellulaires partenaires de la polymérase. J'ai ainsi étudié trois protéines cellulaires : la protéine eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eEF1A1), la protéine Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNPH2) et la protéine Transforming Growth Factor beta-1-induced transcript 1 protein (TGFβ1I1). Comme pour l'étude précédente, une diminution d'expression par shRNA a été développée dans le but de déterminer leur rôle dans le cycle rabique.

I. Analyse du crible en double hybride et recherche

bibliographique :

Les protéines cellulaires partenaires de la polymérase rabique ont été identifiées par crible double hybride en levure dans le cadre de la Thèse du Dr. Mohamed Ben Mechlia (Université Paris VI, 2011). C'est à cette occasion que la protéine hStaufen 1 a été originellement identifiée. Mon premier travail a consisté à ré-analyser le crible original afin d'identifier d'autres partenaires pertinents dans le déroulement du cycle réplcatif rabique. Ainsi, trois critères de sélection ont été appliqués : le premier est que le ou les partenaires soient retrouvé au minimum 2 fois dans le crible, encore mieux s'il est interagissant à la fois avec la protéine L entière et le domaine N-ter ou C-ter. Le deuxième est que les fonctions biologiques et la localisation subcellulaire naturelle du partenaire soient compatibles avec la réplication cytoplasmique du virus de la rage. Le troisième, moins stringent, est que le partenaire soit impliqué dans le cycle réplcatif d'autres virus. L'ensemble de cette sélection s'est faite par étude bibliographique de vingt partenaires retrouvés deux fois ou plus dans le crible double hybride et a permis la sélection de cinq protéines (Cf.fig29).

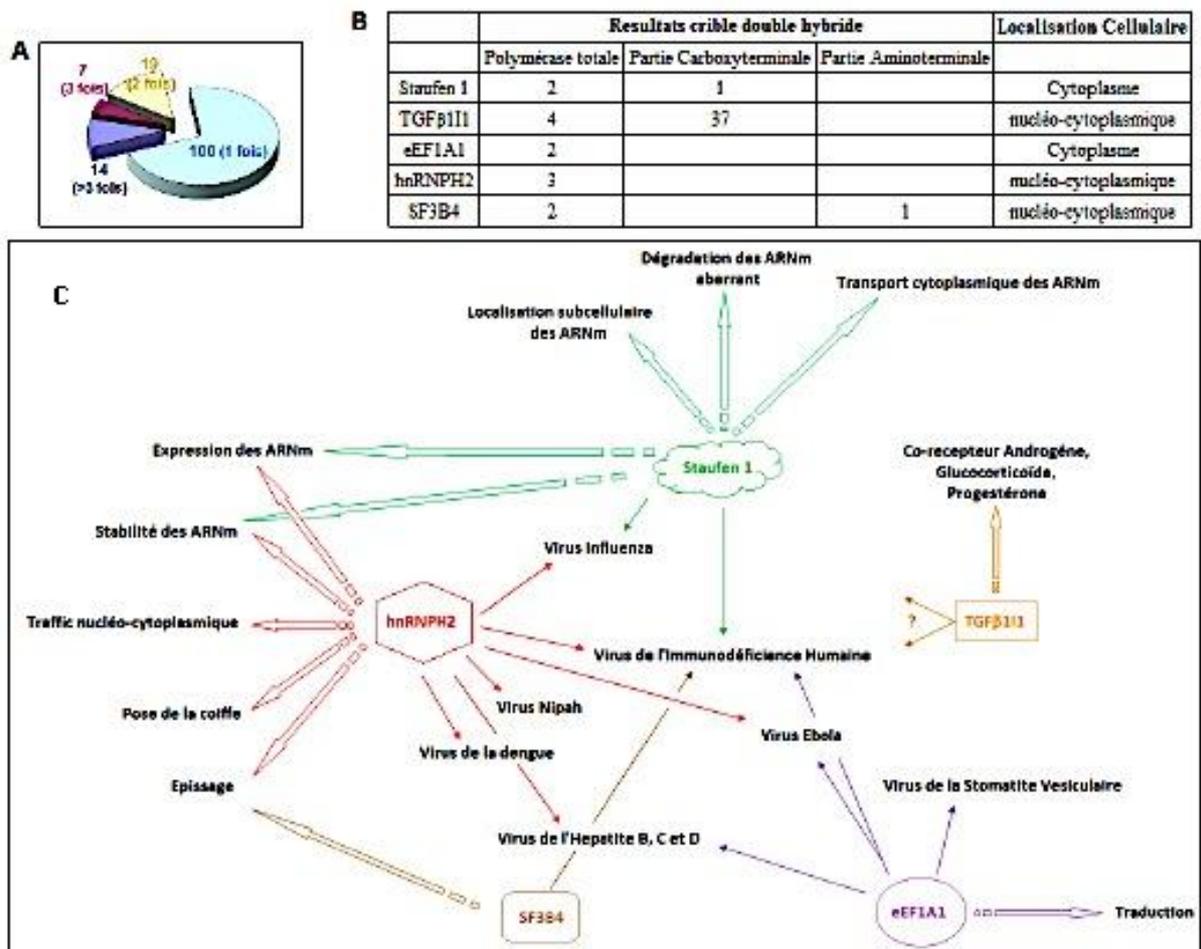


Figure 29 : Analyse du criblé en double hybride de la polymérase du virus de la rage contre une banque d'ADNc humaine.

(A) Diagramme circulaire de l'ensemble des interacteurs retrouvés durant le criblé et regroupés selon leur représentation dans le criblé.

(B et C) Analyse bibliographique de cinq partenaires de la polymérase selon leur représentation dans le criblé, leur localisation subcellulaire, leurs fonctions biologiques et leur rôle dans le cycle d'autres virus. Un seuil d'une représentation minimale de deux fois dans le criblé permet une première sélection des protéines retrouvées dans le criblé. Elles sont classées par localisation subcellulaire afin de ne sélectionner que les protéines se trouvant dans le cytoplasme, compartiment où se réplique le virus de la rage. Une analyse bibliographique des protéines permet d'identifier celles possédant des activités biologiques en accord avec le cycle réplcatif du virus de la rage et des activités assurées par la polymérase de la rage (transcription et réplcation du génome) (C). Egalement, les fonctions de ces protéines dans le cycle réplcatif d'autres virus sont autant d'éléments qui permettent d'affiner la sélection de partenaires à haut potentiel pour le virus de la rage (C). Ces critères de sélection nous ont permis de choisir les protéines eEF1A1, hnRNPH2, TGFβ111 et SF3B4 pour étudier leur rôle en tant que partenaires du virus de la rage.

II. Biologie moléculaire

A. Souches bactériennes et milieu de culture bactérien

Les souches bactériennes d'Escherichia Coli DH5 α et One Shot Top10 (Thermofischer) ont été utilisées pour l'amplification des plasmides et la réalisation des clonages.

Les bactéries sont cultivées avec le milieu de base Luria Broth (LB) : Bactotryptone 1% pH 7,5 ; extrait de levure 0,5% et NaCl 1%. Le milieu est additionné d'Ampicilline (50 μ g/ml) ou de Kanamycine (50 μ g/ml).

B. Oligonucléotides

1. Small Interfering RNA (siRNA)

Les séquences des siRNA utilisées pour diminuer l'expression des protéines cibles ont été recherchées avec l'aide du moteur de recherche Pubchem rubrique « substance » (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#> NCBI). Plusieurs constructions ont été ainsi réalisées et testées indépendamment afin de sélectionner celles présentant le meilleur profil de diminution d'expression de la protéine ciblée.

Séquences siRNA								
hStaufen 1			hnRNP H2			SF3B4		
s13546	Sens 5'-3'	GAACGAATTTGTATCTCTT	J-013245-18	Sens 5'-3'	CTCGAAAGCTCATGGCTAT	S20050	Sens 5'-3'	GTCCTATCACCGTATCTTA
	Antisens 5'-3'	AAGAGATACAAATTCGTTTC		Antisens 5'-3'	ATAGCCATGAGCTTTCGAG		Antisens 5'-3'	TAAGATACGGTGATAGGAC
s13548	Sens 5'-3'	GGCTGTAGGAGTTAGTCAA	J-013245-20	Sens 5'-3'	GGCAAGTGGTGCGCTTAT	S20049	Sens 5'-3'	GTTATGCCTTTATTAATTT
	Antisens 5'-3'	TTGACTAACTCCTACAGCC		Antisens 5'-3'	ATAAGCGCCACCACCTGCC		Antisens 5'-3'	AAATTAATAAAGGCATAAC
eEF1A1			TGFB11					
s4479	Sens 5'-3'	GAAGTAAAATCTGTCGAAA	s14058	Sens 5'-3'	CCACCTGTACAGCACGGTA			
	Antisens 5'-3'	TTTCGACAGATTTTACTTC		Antisens 5'-3'	TACCGTGCTGTACAGGTGG			
s4478	Sens 5'-3'	GGAAGTCAGCACTTACATT	s14057	Sens 5'-3'	CGGTTGCTCAGGAACCTA			
	Antisens 5'-3'	AATGTAAGTGCTGACTTCC		Antisens 5'-3'	TAAGTTCTGAAGCAACCG			
s4477	Sens 5'-3'	CCATGAAGCTTTGAGTGAA						
	Antisens 5'-3'	TTCACCTCAAAGCTTCATGG						

Tableau 1 : Séquences des siRNA testées contre les partenaires de la polymérase sélectionnés.

Pour chaque partenaire, 2 à 3 séquences d'ARNs sens et antisens sont testées. Leur positionnement sur le shRNA est montré sur la figure 31. Ces séquences ont été recherchées avec le moteur de recherche Pubchem rubrique substance (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#>)

2. Clonage

Séquences clonage interacteurs		
	primer Foward 5'-3'	primer reverse 5'-3'
hnRNP H2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC atgatgctgagcacggaaggcagg	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC ctaagcaaggttgactgatagtc
eEF1A1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC atgggaaaggaaaagactcatat	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC tcatttagcctctgagctttctg
TGFB111	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC atggaggacctggatgcc	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC tcagccgaagagcttcaggaagca
SF3B4	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC atggctgccgggccgatctcga	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC ttactgaggagagggcctcgaag

Tableau 2 : Oligonucléotides utilisés pour le clonage des partenaires de la polymérase selon la méthode « gateway ».

Les séquences nécessaires pour le clonage « gateway » sont indiquées en majuscule, les séquences en minuscule correspondent aux séquences codantes les protéines sélectionnées.

C. Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume final de 50µl : matrice d'ADN (100ng), oligonucléotides (10µM), dNTP (10mM), MgSO₄ (50mM) avec 1 unité de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity dans le tampon de PCR High fidelity 1x (Life Technologies).

Le programme de PCR utilisé est :

Dénaturation initiale	94°C	1 minutes
30 cycles	$\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C (dénaturation)} \\ 55\text{-}65^{\circ}\text{C (hybridation)} \\ 68^{\circ}\text{C (élongation)} \end{array} \right.$	15 secondes
		30 secondes
		1min/Kb
Extension finale	68°C	3 minutes

La température d'hybridation de chaque oligonucléotide est calculée avec le tm calculator du site NEB (<https://tmcalculator.neb.com/>) pour l'adapter à chaque jeu d'oligonucléotides. La température d'élongation est adaptée en fonction de la taille du fragment à amplifier.

D. Purification des produits PCR

Les produits PCR obtenus sont ensuite déposés sur gel TAE (40mM tris-HCl pH 7,6 ; 20mM acide acétique et 1mM EDTA) d'agarose 1%, additionné de bromure d'éthidium (BET), et soumis à une électrophorèse à 100V durant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite purifiés avec le kit Nucleospin PCR Clean up (Macherey-Nagel).

E. Assemblage des fragments dans les plasmides et transformation bactérienne

Les plasmides (pSuper.Basic et pTrip-GFP, Cf.I.G.1) sont linéarisés par digestion enzymatique (BglIII, HindIII, ClaI et NheI) selon le fournisseur (Roche) puis purifiés sur gel d'agarose 1% (Cf. I.D).

Les fragments de PCR amplifiés sont insérés, après digestion enzymatique, dans les plasmides selon le protocole de la T4 DNA ligase (NEB) avec un ratio d'une molécule de vecteur pour 3 molécules d'insert. Après une incubation d'une heure à 37°C, la réaction de ligation est inactivée 10 minutes à 65°C. Le produit de ligation est stocké à -20°C.

Un volume de 50µl de bactéries électrocompétentes DH5α est transformé avec 2µl du produit de ligation. Les bactéries sont incubées 20 minutes à 4°C, choquées par choc thermique 30 secondes à 42°C, placées 2 minutes dans la glace, puis 200µl de Super Optimal Broth (SOC : Tryptone 2% ; extrait de levure 0,5% ; NaCl 10mM ; KCl 2,5mM ; MgCl₂ 10mM ; MgSO₄ 10mM et glucose 20mM) sont ajoutés avant une incubation d'une heure à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite étalées en boîte de pétri sur un milieu LB sélectif gélatinisé, additionné d'antibiotique (ampiciline, kanamycine).

Après incubation d'une nuit à 37°C, les colonies bactériennes sont sélectionnées puis ensemencées dans 5 ml de milieu LB sélectif (ampiciline, kanamycine) et incubées à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite lysées et l'ADN plasmidique est purifié en utilisant le kit Nucleospin plasmid (Macherey Nagel). Les plasmides sont digérés et analysés sur gel d'agarose 1% pour vérifier la présence de l'insert, puis séquencés (Eurofins) pour vérifier l'exactitude de la construction.

Le clonage par méthode Gateway se base sur une recombinaison *in vitro* à l'aide d'une clonase. Le principe dérive du mécanisme utilisé par les bactériophages à intégrer leur matériel génétique dans l'ADN bactérien. Les inserts d'intérêts sont obtenus par PCR avec des amorces contenant en 5' les séquences B1 et B2 pour la recombinaison *in vitro* de type BP avec le plasmide pDONR207 (Invitrogen). La recombinaison BP se fait avec 4µl de produit PCR (flanqués des séquences 5'-attB1 et attB2-3'), 500ng de plasmide pDONR (Invitrogen) (portant les séquences 5'-attP1 et attP2-3') et 2µl de BP clonase (Gateway®BP clonase™ II Enzyme mix, Invitrogen) à température ambiante durant 2h (volume final 8µl). L'insertion de la cassette d'intérêt remplace la séquence *ccdB*, toxique pour les bactéries. Les bactéries DH5α sont transformées, sélectionnées par leur résistance à la gentamicine, puis l'ADN plasmidique est purifié comme indiqué précédemment (Nucleospin plasmid). Les plasmides sont séquencés pour valider la construction. Cette première étape de clonage permet de constituer une banque de plasmides donneurs pour distribuer l'insert dans n'importe quel plasmide de destination (double hybride, tag protéique, ...) portant les séquences 5'-attR1 et attR2-3'. Cette seconde recombinaison de type LR est réalisée avec 500ng de plasmide pDONR, 500ng de plasmide pGBKT7 (Invitrogen) (portant les séquences 5'-attR1 et attR2-3') et de 2µl de LR clonase (Gateway®LR clonase™ II Enzyme mix, Invitrogen) à température ambiante durant 2h (volume final 20µl). Cette réaction permet l'échange de la séquence *ccdB*, portée par le plasmide « de destination », par l'insert d'intérêt, porté par le plasmide donneur, permettant la croissance des bactéries transformées. L'ADN plasmidique est là encore purifié et séquencé pour validation.

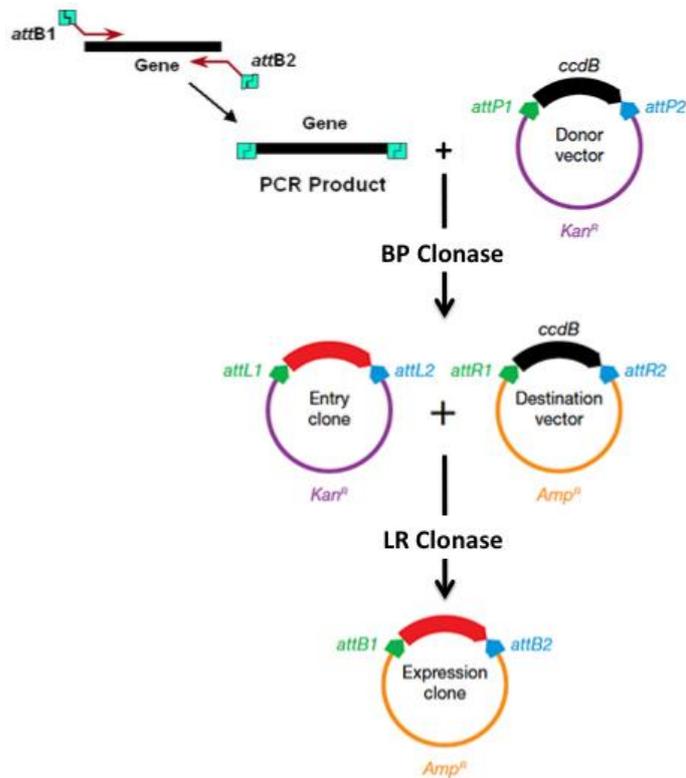


Figure 30 : Etapes de clonage par la technique gateway

Le clonage repose sur la recombinaison *in vitro* des séquences B1-B2 et P1-P2, L1-L2 et R1-R2 dérivée du bactériophage λ . L'insertion de l'insert permet d'éliminer le gène *ccdB* qui est un facteur de sélection négatif pour les bactéries DH5 α car il est toxique. Le deuxième facteur de sélection est la résistance aux antibiotiques présents dans le milieu de culture grâce aux gènes de résistance portés par les plasmides. (D'après Thermofischer)

F. Double hybride en levure

Les levures sont cultivées dans 5ml de milieu riche YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose : 20g/L peptone, 10g/L extrait de levure, 20g/L dextrose) à 30°C, pour une croissance optimale. Le lendemain, cette culture est diluée afin d'obtenir une Densité Optique (DO)_{600nm} = 0,1. Les levures sont de nouveau incubées à 30°C jusqu'à obtenir une DO_{600nm} = 0,8-1 marqueur d'une phase exponentielle de croissance. Un volume de 0,5ml de culture de levure est lavée deux fois dans l'eau puis dans une solution TE/LiAc (Tris-HCL 10mM pH 7,5 ; EDTA 1mM ; acétate de lithium 100mM). Les levures sont ensuite mélangées avec 250ng de plasmide, 2 μ g de sperme de saumon dénaturé (Sigma), une solution de polyéthylène glycol (8 vol. de PEG 50% ; 1 vol. d'acétate de lithium 1M, 1 vol. de TE 10X [Tris-HCL 100mM pH 7,5 ; EDTA 10mM]) pour un volume final de 100 μ l. Pour la

transformation, le mix est incubé 30 minutes à 30°C puis soumis à un choc thermique à 42°C pendant 15 minutes. Le mélange est centrifugé pour éliminer le PEG et les levures sont resuspendues dans de l'eau puis étalées sur un milieu synthétique complet dépourvu des acides aminés leucine, tryptophane et histidine.

Le plasmide pAD-Gal4, codant la Leucine, est utilisé pour fusionner la protéine cellulaire choisie au domaine d'activation de Gal4. Le plasmide pGBKT7, codant le Tryptophane, est utilisé pour fusionner la polymérase du virus de la rage au domaine de fixation à l'ADN de Gal4. La co-transfection des levures par les deux plasmides est réalisée en milieu sans Leucine, ni Tryptophane, ni Histidine car l'interaction des protéines avec la polymérase reconstitue le promoteur transcriptionnel Gal4 qui contrôle la synthèse du gène de l'Histidine. L'ajout, de concentrations croissantes de 3AT au milieu (2mM, 4mM, 8mM et 10mM) permet l'élimination des interactions faibles non-spécifiques. Le 3AT est un inhibiteur compétitif de l'imidazole-glycerol-phosphatase, impliquée dans la biosynthèse de l'histidine.

G. Production des vecteurs lentiviraux

1. Design des shRNAs et clonage

La construction des shRNAs est faite avec les séquences siRNAs (Cf.I.B.1), d'après le protocole d'Oligoengine® :

Oligo sens : 5'- GATC**CCC**-siRNAsens-**TTCAAGAGA**-siRNAantisens-**TTTTTA**-3'

Oligo anti : 5'- AGCT**TAAAA**-siRNAsens-**TCTCTTGAA**-siRNAantisens-**GGG**-3'

3µg (1µl) de chaque oligos sont mélangés à 48µl de tampon d'hybridation (100mM NaCl, 50mM Hepes pH 7) pour l'appariement selon le programme :

Dénaturation	90°C	4 minutes	
Hybridation progressive		70°C	10 minutes
		37°C	20 minutes
		10°C	10 minutes
		4°C	20 minutes

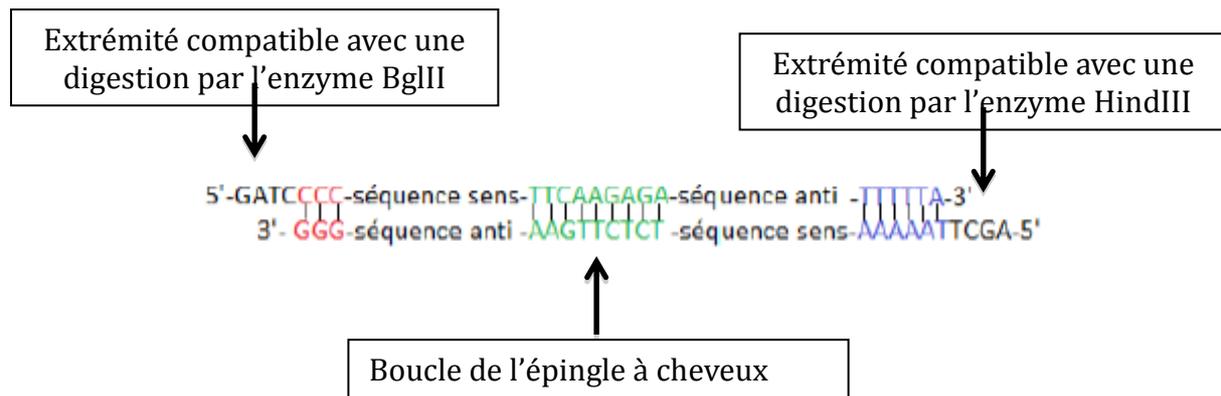


Figure 31 : Représentation schématique de la cassette shRNA avant insertion

Les extrémités 5' débordante BglIII et HindIII, respectivement de droite à gauche, permettent l'insertion de cette cassette, sans qu'elle soit traitée par enzyme de restriction. Le plasmide est préalablement digéré par le jeu d'enzyme BglIII (A/GATCT) et HindIII (A/AGCTT) pour permettre cette insertion. L'appariement du site BglIII de la cassette avec celui du plasmide conduit à la mutation du site de restriction (A/GATCC). L'absence de digestion du plasmide par l'enzyme BglIII constitue le contrôle d'insertion de la cassette.

L'hybridation des oligos permet la production d'un ADN double brin avec des extrémité 5' sortantes compatibles avec un clonage dans le plasmide pSuper.Basic (Oligoengine Invitrogen) préalablement digéré 1h à 37°C avec les enzymes Bgl II et Hind III (NEB).

Ce clonage intermédiaire permet l'acquisition du promoteur H1 présent en amont du site d'insertion. C'est un promoteur de classe III de l'ARN polymérase III cellulaire responsable de la transcription d'ARN court tels que les tARNs ou l'ARN ribosomique 5S. Il présente l'avantage d'être fonctionnel pour une grande variété de séquences, d'être spécifique et d'être peu toxique pour les cellules.

Après vérification par digestion enzymatique de la mutation du site BglIII (Cf.fig31) et séquençage de la cassette H1+shRNA, celle-ci est excisée par digestion avec les enzymes XbaI et ClaI durant 1h à 37°C (NEB), purifiée sur gel d'agarose 1% avec le kit Nucleospin PCR Clean up (Macherey-Nagel), puis le fragment est recloné dans le plasmide pTrip-GFP préalablement digéré par les enzymes ClaI et NheI (NEB) selon le même mode opératoire. Ce plasmide comprend : (i) la séquence cis-active responsable de la formation de l'ADN flap, structure triplex d'ADN nécessaire pour l'import nucléaire du transgène (ii) la séquence codante la Green Fluorescent Protein (GFP) sous contrôle du promoteur CMV, comme

marqueur de transduction ; (iii) en revanche, la séquence 5' U3 est déléetée pour bloquer la réplication du vecteur. La cassette portant le shRNA est insérée dans la région 3' U3 du plasmide dans le sens inverse par rapport au promoteur CMV pour éviter que celui-ci, de part sa forte activité transcriptionnelle, ne perturbe l'expression du shARN. Ce positionnement de la cassette lui permet d'augmenter son expression dans les cellules transduites puisque la région U3 est dupliquée durant la transcription inverse (Di Nunzio, Danckaert et al. 2012).



Figure 32 : Représentation des séquences codant la GFP et le shRNA après intégration dans le plasmide pTrip-GFP

Le sens transcriptionnel de la cassette H1-shRNA est à l'inverse de la cassette CMV-GFP pour éviter que le promoteur CMV, de part sa forte activité transcriptionnelle, ne perturbe l'expression du shRNA.

2. Production des vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux sont produits à l'aide de trois plasmides (Fig.33) :

- Fig 33A : Le plasmide vecteur (pTrip-GFP) portant la cassette H1+shARN tel que décrit ci-dessus. Il porte la séquence psi (Ψ) ce qui permet l'encapsidation de l'ARN produit.
- Fig 33B : Le plasmide d'encapsidation, codant *gag* et *pol* sous le contrôle du promoteur CMV. Ce plasmide permet la production des protéines de capsid et enzymatiques du HIV, dont l'intégrase ce qui permet au vecteur de s'intégrer. Ce plasmide est déléeté de la séquence psi (Ψ) afin que l'ARNm produit ne soit pas encapsidé et que le vecteur produit ne puisse générer de nouveaux vecteurs.
- Fig 33C : Le plasmide codant la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G), aussi sous le contrôle du promoteur CMV. Cette glycoprotéine, qui permet un large tropisme de transduction, est intégrée dans l'enveloppe de la particule virale lors du bourgeonnement.

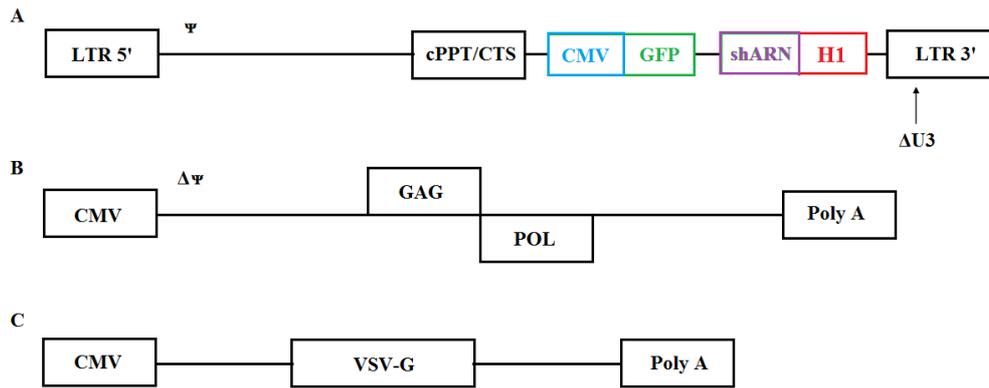


Figure 33 : Représentation schématique des trois plasmides nécessaires pour la production des vecteurs lentiviraux portant les shARNs.

(A) Plasmide vecteur portant la séquence codant la GFP et le shARN, bordée des séquences LTR, comportant la séquence flap facilitant la pénétration nucléaire et la séquence psi (ψ) permettant l'encapsulation.

(B) Plasmide permettant l'expression des protéines de structure et des enzymes pour la production des vecteurs.

(C) Plasmide codant pour la glycoprotéine d'enveloppe du VSV.

10 μ l des plasmides vecteur et d'encapsulation, et 2.5 μ l du plasmide d'enveloppe, tous à une concentration de 1 μ g/ μ l, sont mélangés et 500 μ l composés de 150 μ l CaCl₂ 2M + 350 μ l H₂O sont additionnés. Ce mélange est déposé au goutte à goutte sous agitation dans un second tube contenant le même volume de tampon Hepes 0.05M pH 7,1 ; le pH est très important pour l'efficacité de la transfection. Après 10 min d'incubation à température ambiante, le mélange est déposé sur un tapis de 20 millions de cellules HEK293T dont le milieu (cf « culture cellulaire ») a été changé 1h auparavant par 8 ml de milieu frais. Le lendemain, le milieu est de nouveau changé mais le volume est réduit à 6ml pour concentrer les vecteurs. Au jour 2, les surnageants sont récoltés, clarifiés par centrifugation, 900 g pendant 5 minutes, puis aliquotés et conservés à -80°C pour la stabilité de l'ARN.

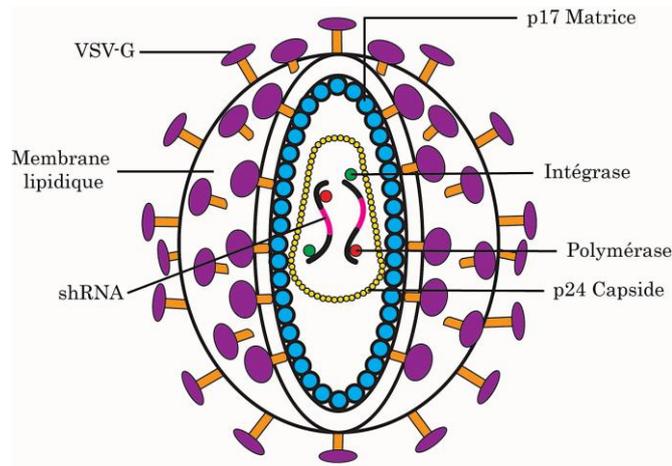


Figure 34 : Représentation d'un vecteur lentiviral et de ses composants

Le vecteur lentiviral est composé d'une membrane lipidique dans laquelle est enchâssée la glycoprotéine souhaitée, ici celle du VSV. Cette membrane enveloppe une capside, constituée de la protéine p24, qui renferme deux molécules d'ARN codant, dans notre cas, un shRNA ciblant une protéine d'intérêt, ainsi que l'ensemble de la machinerie enzymatique du VIH-1. La reverse transcriptase permet de transcrire l'ARN en ADN, et l'intégrase permet son intégration dans le génome de la cellule transduite.

3. Titrage des vecteurs lentiviraux

Après avoir évalué la cytotoxicité des vecteurs lentiviraux par relargage d'ATP avec le kit CellTiter-Glo® Assay (Promega), les particules viables sont titrées afin de définir les MOTs (*Multiplicity Of Transduction*) lors de la transduction des cellules.

Une gamme décroissante de vecteur de raison 10 (1ml; 100µl; 10µl; 1µl; 0.1µl et 0.01µl) est déposée sur un tapis cellulaire et mis en milieu DMEM (Dulbeco's modified eagle medium) contenant 5% de sérum de veau fœtal (SVF), 5% de CO₂ durant 96 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite trypsinées et fixées avec du Cell fix 1X (BD Science) puis stockées à 4°C durant une nuit. Le titre est évalué par cytométrie en flux grâce au transgène GFP selon la formule suivante :

$$\text{Titre} = \text{nbr de cellules à J0} \times \% \text{ cellules GFP}^+ \text{ au J4} \times \text{facteur de dilution du vecteur}$$

Le titre est reporté au nombre de cellules transduites à J0 car les vecteurs sont intégratifs, permettant le maintien du signal GFP dans les cellules filles.

Le titrage des vecteurs permet d'établir le nombre de MOT appliqué aux cellules et de le rapporter au pourcentage de transduction :

$$\text{Pourcentage de transduction} = \text{nbr cellules GFP}^+ / \text{nombre cellules totales}$$

H. RT-qPCR

Les ARNs utilisés ont été obtenus par purification de surnageant cellulaire (Cf.II.H.1).

Dans un premier temps, une RT-PCR est effectuée selon le kit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Un premier mix, avec 200ng d'ARN, 2µM d'oligonucléotides « Fw » (Cf.tableau3) et 10mM de dNTP, est incubé 5 minutes à 65°C puis 1 minutes à 4°C. Un second mix (10X RT Buffer, 25mM MgCl₂, 0,1M DTT, 4000U RNase Out et 10000U Superscript III RT) est ajouté au précédent mélange. Une incubation de 50 minutes à 50°C, puis de 5 minutes à 85°C est réalisée. Les échantillons sont ensuite placés à 4°C avant d'être centrifugés et traités à la RNase H durant 20 minutes à 37°C afin d'éliminer toute trace d'ARN pouvant contaminer la QPCR.

La QPCR est réalisée avec le produit de RT-PCR auquel est additionné le mix SYBR green (Enzyme Mix, 2X qPCR SYBR ROX Mix, RT Enhancer, 5 µM oligonucléotides [Fw et Rev]) selon le protocole Sybr[®] Green reagents kit (EuroBio). Le programme QPCR utilisé est :

Activation	95°C	15 minutes	} 40x
Dénaturation	94°C	15 secondes	
Hybridation	55°C	30 secondes	
Extension	72°C	30 secondes	

La QPCR est réalisée avec une ABI PRISM 7500 Fast Real-Time Machine (Applied Biosystems).

Cible		Séquence
ARN Génomique	Fw (5'-3')	ACGCTTAACAACCAG
	Rev (5'-3')	GCAGGGTACTTGTACTCATA
ARN Anti-Génomique	Fw (5'-3')	GAGATCTTCTAGCAGTTTCAGTGA
	Rev (5'-3')	GCCAGTTGTTCTTCTGATCTACT

Tableau 3 : Oligonucléotides utilisés pour la RT-QPCR afin de quantifier l'ARN viral génomique et anti-génomique

I. Miniréplicon

Le miniréplicon est un système minimum permettant d'évaluer la fonctionnalité des activités de transcription et réplication du complexe RNP. Il se base sur l'utilisation de cinq plasmides codant respectivement les protéines N, P, L, renillia et luciférase. Les quatre premiers plasmides sont sous le contrôle de l'ARN polymérase T7, exprimée stablement par les cellules HEK293T T7. Le plasmide codant la renillia permet d'évaluer l'efficacité de transfection et de normaliser les résultats obtenus. Le dernier plasmide code la luciférase sous contrôle des signaux transcriptionnels rabiques. Ainsi, l'activité transcriptionnelle de la RNP, recrée dans le cytoplasme, peut être quantifiée par le dosage de l'activité luciférase. Après transduction préalable des cellules par des shRNA spécifiques, ce système permet d'évaluer l'effet de la diminution d'expression d'une protéine sur l'activité enzymatique du complexe RNP.

Les cellules HEK293T T7 sontensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 35 000 cellules par puits dans un milieu du DMEM 10% SVF antibiotique (Penicillin-Streptomycin, Thermofisher). Après 24h de culture à 37°C en atmosphère 5% CO₂, le surnageant est éliminé et les cellules sont tranfectées avec les plasmides pTM1-N (0,1µg), pTM1-P (0,1µg), pTM1-L (0,02µg), pBI.luc (0,02µg) et pGL4.RI (0,01µg) avec 3µl de Fugene/µg d'ADN. Pour ce faire, le mélange de plasmides est d'abord incubé pendant 10 minutes à température ambiante dans 50µl de DMEM sans SVF antibiotique puis déposé sur le tapis cellulaire. Après ajout de 50µl de milieu DMEM 10% SVF antibiotique, les cellules sont incubées durant 48 heures à 37°C en atmosphère 5% CO₂. Les plasmides pTM1 contiennent un *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) qui assure la traduction des ARNm non coiffés dans le cytoplasme, ce qui est le cas des ARNm messagers produits par la polymérase T7. Selon l'expérience, les cellules sont préalablement transduites avec les vecteurs lentiviraux ciblant les partenaires cellulaires de la polymérase 72h avant la transfection.

Après les 48 heures d'incubation, le surnageant est éliminé et les cellules sont lysées dans du tampon de lyse passive (Promega). 50µl de chaque lysat est transféré dans une plaque 96 puits à fond blanc et 50µl de réactif est additionné en suivant les préconisations du kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega). La luciférase est quantifiée par un lecteur de plaques (Berthold).

III. Biologie cellulaire

A. Souches cellulaires

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées :

Les cellules BSR (clone de cellules BHK, cellules de rein de hamster) sont utilisées pour le titrage des surnageants de virus rabique.

Les cellules HEK293T (cellule de rein embryonnaire humaine) sont utilisées pour la production des vecteurs lentiviraux et constituent le modèle non neuronal de l'étude des partenaires cellulaires de la polymérase du virus de la rage.

Les cellules HEK293T-T7 expriment de façon stable la polymérase T7 utilisée pour le miniréplicon. Elles ont été préalablement transduites par un vecteur lentiviral contenant le gène codant la polymérase T7.

Les cellules SK-N-SH (cellules de neuroblastome humain) constituent le modèle neuronal de l'étude des partenaires cellulaires de la polymérase du virus de la rage.

Les cellules SK-N-SH D ont été obtenues auprès du Dr C. Préhaud (Institut Pasteur). Il s'agit de cellules SK-N-SH amenées à un stade de différenciation neuronale plus poussé par bain d'acide transrétinoïque (ATRA) pendant 15 jours. Durant ce traitement, les cellules sont cultivées dans une boîte de culture qui ne permet pas l'adhérence des cellules pour la formation de neurosphères. Elles sont utilisées pour l'étude du transport intracellulaire des RNPs.

Les cellules HEK293T hStaufen 1 Knock Down (KD), eEF1A1 KD et hnRNPH2 KD sont des cellules HEK293T transduites avec le vecteur lentiviral exprimant le shRNA ciblant les ARNm des protéines respectives. Après transduction, ces cellules sont incubées 72h à 37°C en atmosphère 5% CO₂ puis les cellules présentant un niveau d'expression de GFP suffisant sont sélectionnées par cytométrie en flux. Cette population cellulaire sélectionnée est diluée jusqu'à 1 cellule pour 200µl de milieu, volume qui est ensuite déposé dans chaque puits d'une plaque 96 puits puis incubé 7 jours à 37°C en atmosphère 5% CO₂. Seuls les puits ne contenant qu'une cellule sont sélectionnés puis cultivés jusqu'à obtenir assez de cellules afin d'établir un stock. Chaque clone est testé pour son niveau de diminution d'expression de la protéine ciblée par Western Blot et immunofluorescence.

L'ensemble des cellules est cultivé à 37°C, sous atmosphère 5% de CO₂ en milieu DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'un cocktail d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (Eurobio).

B. Souches virales

Les souches PV (Pasteur), SAD-B19 (*Street Alabama Dufferin*), SAD-mcherryP et CVS (Challenge Virus Standard) sont utilisées. La souche SAD-Pmcherry a été obtenue auprès de S. Finke (Institut Friedrich Loeffler) et code la phosphoprotéine en fusion N-terminale avec la mCherry. Les souches sont amplifiées en cellules BSR.

C. Transfection des cellules

La transfection des cellules se fait en utilisant de la lipofectamine 2000 (Invitrogen) suivant les instructions du fournisseur. Les cellules sont cultivées en plaque 96 puits jusqu'à 80% de confluence. Un mix de 3µl de lipofectamine, 1µg d'ADN et 100µl de DMEM est incubé à température ambiante pendant 15 minutes. 100µl supplémentaire de DMEM est additionné au mix qui est déposé sur le tapis cellulaire préalablement lavé au PBS 1X. Après 1h d'incubation à 37°C, le milieu de transfection est remplacé par un milieu DMEM 10% SVF avec antibiotique. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C le temps souhaité.

D. Transduction des cellules

Les cellules sont transduites avec un vecteur lentiviral, contrôle ou contenant un shRNA, fraîchement décongelé (stock gardé à -80°C). A J-1, 250 000 cellules sont mises en culture dans une plaque 6 puits. A J0, le milieu de culture est renouvelé par un milieu DMEM 10% SVF avec antibiotiques, additionné du volume de vecteurs lentiviraux au MOT souhaité. Les cellules sont incubées 72h à 37°C en atmosphère 5% CO₂ avant d'être infectées ou lysées. Ces 72h sont nécessaires pour que le transgène puisse s'intégrer dans la cellule, s'exprimer et enclencher le mécanisme de diminution d'expression par interférence d'ARN impliquant les complexes Drosha, Dicer et Risc/Argonaute.

Le temps de demi-vie de la protéine, ainsi que son niveau d'expression peuvent influencer l'efficacité de la diminution d'expression. Une demi-vie élevée impliquera un

temps d'incubation plus long avant de voir un effet sur l'expression de la protéine. De même, une expression forte de la protéine nécessitera une quantité de vecteurs appliquée aux cellules plus importante.

E. Infection des cellules

Les cellules à 80% de confluence sont infectées pendant 3 heures à 37°C avec un aliquot de virus fraîchement décongelé (stock à -80°C) dilué dans du milieu DMEM 2% SVF à la multiplicité d'infection (MOI pour *Multiplicity Of Infection*) voulue. Une fois le virus adsorbé, l'inoculum est retiré, les cellules sont lavées avec du DMEM et incubées à 37°C en atmosphère 5% CO₂ dans un milieu DMEM 10% SVF et antibiotiques durant le temps souhaité.

F. Préparation d'extraits cellulaires totaux

Après lavage par du PBS 1X, le tapis cellulaire est récupéré par grattage dans 1ml de PBS 1X puis centrifugés 10 min à 2000g. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans un tampon de lyse NP-40 (150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris-HCl pH 8 et antiprotéases Mini Complete EDTA free (Roche)). Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, l'extrait est centrifugé 15 min à 16 000 g à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est stocké à -20°C et la quantification protéique se fait par BCA avec le kit Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoFischer).

G. Electrophorèse et Western Blot

Les extraits cellulaires sont additionnés de tampon Laemmli+DTT 4X pour obtenir une concentration finale d'1X et sont dénaturés à 95°C durant 5 minutes. Ils sont ensuite déposés sur un gel d'électrophorèse Precast-Gel 4-15% (biorad). La migration est réalisée dans un tampon Tris-Base 25mM, Glycine 192mM et SDS 0,1% à 100 volts durant 1 heure. 5µl de marqueur de poids moléculaire (ThermoFischer) migrent en parallèle.

Le transfert des protéines du gel vers une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare Amersham™) est réalisé à 200 milliampères (mA) durant 1h30 dans un tampon de transfert (Tris-Base 12,5 mM, Glycine 96 mM, SDS 0,05% et Ethanol 20%). La membrane

est ensuite saturée à l'aide du tampon de saturation PBS 1X-Tween 20 0,1%-lait 5% durant 2 heures à température ambiante, afin d'empêcher la fixation aspécifique des anticorps sur la membrane.

Après saturation, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires reconnaissant les protéines ciblées, préalablement dilués à la concentration souhaitée dans le tampon de saturation. Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS-Tween 20 0,1%, la membrane est de nouveau incubée durant 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires, reconnaissant l'espèce animale de l'anticorps primaire, couplés à la peroxydase dans le tampon de saturation.

La membrane est de nouveau lavée 3 fois au PBS-Tween 20 0,1% durant 5 minutes puis les bandes sont révélées avec le kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFischer). La membrane est exposée à un film radiographique (GE healthcare) en chambre noir pendant des temps différents.

H. Préparation des extraits d'ARN

Les ARNs viraux extraits du surnageant et des cellules proviennent d'un même puits de plaque 6 puits afin de suivre, pour une même population cellulaire, les protéines virales intracellulaires et le bourgeonnement viral.

1. ARNs viraux des surnageants cellulaires

Les ARNs viraux relargués dans les surnageants cellulaires sont purifiés avec le kit QIAamp Viral RNA (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. Les surnageants sont clarifiés 6 minutes à 2000g afin d'éliminer toutes cellules présentes. Une fraction de ce surnageant est ensuite lysée avec le tampon de lyse du kit puis purifiée sur colonne favorisant la fixation des ARNs. L'éluat est ensuite quantifié au nanodrop (ThermoFisher) et la quantité d'ARN souhaitée est traitée à la Turbo DNA (Invitrogen) 10 minutes à 37°C afin d'éliminer toute trace d'ADN. L'intégrité des ARNs est vérifiée sur gel d'agarose 1%. Les ARNs sont ensuite aliquotés et stockés à -80°C.

2. ARN viraux cellulaire

Les ARNs cellulaires sont purifiés avec le kit Nucleospin RNA (Macherey Nagel) selon les instructions du fournisseur. Les cellules sont lavées et reprises dans 1 ml de PBS 1X, puis centrifugées 6 minutes à 2000 g. Le culot cellulaire est lysé dans le tampon de lyse du kit additionné de β -mercapto-ethanol (1% final). Les ARNs sont ensuite purifiés sur colonne et traités à la DNase 15 minutes à température ambiante (Macherey Nagel). L'éluat est quantifié au nanodrop puis aliquoté et stocké à -80°C .

I. Anticorps utilisés

Anticorps primaire		
Référence (fournisseur)	Cible (espèce)	Dilution (utilisation)
(FDI)	Anti-N monoclonal (souris)	1/500 (Immunofluorescence)
laboratoire	Anti-RNP polyclonal (lapin)	1/500 (Immunofluorescence) 1/5000 (Western Blot)
(D. Blondel)	Anti-P monoclonal (souris)	1/1000 (Western Blot)
laboratoire	Anti-L polyclonal (lapin)	1/10000 (Western Blot)
ab73478 (Abcam)	Anti-hStaufen 1 polyclonal (lapin)	1/1000 (Western Blot) 1/500 (Immunofluorescence)
ab 157455 (Abcam)	Anti-eEF1A1 monoclonal (lapin)	1/500 (Immunofluorescence) 1/1000 (Western Blot)
HPA001359 (Atlas Antibodies)	Anti-hnRNPH2 polyclonal (lapin)	1/250 (Western Blot)
ab193352 (Abcam)	Anti-kinésine monoclonal (lapin)	1/1000 (Western Blot)
G7121 (Promega)	Anti-β-3-tubuline monoclonal (souris)	1/500 (Immunofluorescence) 1/500 (Western blot)
WH0010146M1 (Sigma)	Anti-G3BP monoclonal (souris)	1/500 (Immunofluorescence)
MABT166	Anti-TOMM22 monoclonal (souris)	1/1000 (Western Blot)

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés

Anticorps secondaire		
Référence (fournisseur)	Cible (espèce)	Dilution (utilisation)
A0545 (Sigma)	Anti-lapin peroxydase (chèvre)	1/10000 (Western Blot)
A9044 (Sigma)	Anti-souris peroxydase (lapin)	1/10000 (Western Blot)
A11008 (ThermoFischer)	Anti-lapin Alexa 488 (chèvre)	1/5000 (Immunofluorescence)
A21428 (ThermoFischer)	Anti-lapin Alexa 555 (chèvre)	1/5000 (Immunofluorescence)
A11001 (ThermoFischer)	Anti-souris Alexa 488 (chèvre)	1/5000 (Immunofluorescence)
A21235 (ThermoFischer)	Anti-souris Alexa 647 (chèvre)	1/5000 (Immunofluorescence)

Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires utilisés

J. Production virale et purification sur gradient de saccharose

1. Clarification

Les cellules HEK239T et SK-N-SH sont cultivées jusqu'à 80% de confluence dans 20 boîtes T160cm² pour chaque type cellulaire. Elles sont ensuite infectées avec la souche PV du virus de la rage à une MOI permettant d'obtenir 90% d'infection. Au bout de 72h d'infection, le surnageant est récupéré et clarifié à 2500rpm pendant 15 minutes.

2. Concentration

Le surnageant est repris puis ultracentrifugé à 4°C pendant 20h à 10000rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est réhydraté durant la nuit à 4°C dans 500 µl de tampon NT (Tris 0,05M ; NaCl 0,13M ; pH=7,6 ajusté avec HCl). Le culot est repris dans 1,5ml supplémentaire de tampon NT pour la resuspension. La production virale ainsi obtenue peut être aliquotée et stockée à -80°C.

3. Purification

La suspension virale est déposée sur un gradient de saccharose 20-50% en tampon NT, puis ultracentrifugée à 27000 rpm pendant 120min à 4°C. La bande opalescente visible à mi-gradient, correspondant aux particules virales complètes, est récupérée à la pompe péristaltique puis diluée dans du tampon NT. La suspension est de nouveau ultracentrifugée à 27000 rpm pendant 120min à 4°C pour éliminer le saccharose. Le culot est repris dans 200µl de tampon NT, aliquoté et stocké à -80°C.

K. Purification MAPs et tubuline

Le principe de cette purification repose sur la propriété de polymérisation et dépolymérisation de la tubuline permettant de purifier par ultracentrifugation les protéines associées aux microtubules (MAPs pour *Microtubule associated proteins*) et les moteurs cellulaires.

Des cellules SK-N-SH D sont cultivées jusqu'à obtenir 5g de cellules sèches. Celles-ci sont lysées dans un 1 volume de tampon de lyse (80mM K-Pipes pH 6,8 ; 1mM EGTA ; 1mM MgCl₂ ; β-mercaptoéthanol, 0,2% triton, 1µM PMSF, inhibiteurs protéases) puis ultracentrifugées à 155000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est incubé 30 minutes à 30°C avec du glycérol (30% final) et 1mM de GTP sur coussin de sucrose (1g Sucrose, glycérol 30% final , 80mM K-Pipes, 1mM EGTA et 1mM MgCl₂) afin de polymériser la tubuline. Après ultracentrifugation à 155000 g pendant 30 minutes à 30°C, le culot est resuspendu dans un tampon BRB80 (80mM K-Pipes pH 6,8 ; 1mM EGTA et 1mM MgCl₂) et laissé à 4°C pendant 30 minutes afin de dépolymériser la tubuline. Après une nouvelle ultracentrifugation de 155000 g à 4°C durant 20 minutes, le surnageant est incubé 30 minutes à 30°C dans un tampon High-Pipes (1 M PIPES ; 10mM MgCl₂ pH 6,9 ; 1 vol of glycérol et 1mM GTP final) qui permet la polymérisation de la tubuline et la dissociation des protéines qui y sont associées. Une ultracentrifugation à 155000 g pendant 30 minutes à 30°C permet d'obtenir les MAPs et les moteurs cellulaires dans le surnageant (fraction MAPs) et la tubuline dans le culot. Ce culot est enfin resuspendu dans le tampon BRB80 durant 30 minutes à 4°C puis ultracentrifugé à 155000 g pendant 20 minutes à 4°C afin de récupérer la tubuline dans le surnageant (fraction tubuline).

Le tampon de la fraction MAPs (High-Pipes) n'étant pas compatible pour notre méthode de Western Blot, la fraction est dessalée sur colonne Vivaspin 500µl (ref VS0291 Sartorius) selon les instructions du fournisseur dans du PBS 1X.

IV. Microscopie

Les cellules sont cultivées dans des chambres présentes sur une lamelle (Ibidi) au nombre de 25000 cellules par chambre durant 24 heures dans du DMEM 10% SVF antibiotiques. Les cellules sont ensuite traitées comme souhaité (transduction seule, transduction puis infection, transfection seule, transfection puis infection, infection seule) puis incubées à 37°C en atmosphère 5% CO₂ durant le temps désiré (de 8 heure à 48 heures).

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS 1X puis fixées avec de l'acétone 80% pendant 10 minutes à -20°C.

Les protéines d'intérêts sont visualisées par incubation séquentielle de deux anticorps après saturation des cellules avec un tampon de blocage (PBS 1X Tween 20 0,1% BSA 1%) pendant 30 minutes à température ambiante. L'anticorps primaire est dilué dans le tampon de blocage à la dilution souhaitée (Cf.tableau 4 et 5) et laissé en contact avec les cellules durant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS 1X puis incubées avec l'anticorps secondaire durant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, pour le fluorochrome. Après trois lavages de PBS 1X, les cellules sont incubées 5 minutes avec du Hoechst 33342 préalablement dilué au 1/2000 dans de l'eau, afin de visualiser les noyaux. Les cellules sont enfin lavées et montées avec du Fluoromount-G (Southern Biotech) puis stockées à 4°C jusqu'à l'acquisition.

L'acquisition des images est réalisée sur un microscope confocal Zeiss LSM 700 inversé équipé d'un objectif à immersion 63X piloté par le logiciel ZEN (Zeiss). Les images sont analysées à l'aide des logiciels ZEN et ImageJ.

hStaufen 1 : partenaire cellulaire de la polymérase rabique.

La protéine hStaufen 1 était un sujet d'étude de l'Unité avant la réalisation de cette thèse. Un doctorant antérieur, Mohamed Ben Mechlia, est l'auteur du criblage initial de la polymérase L rabique et de ses fragments qui a amené à la caractérisation de cet interacteur du fragment COOH-terminal de la polymérase. Mon propre travail de thèse a consisté d'une part à poursuivre le travail entamé sur hStaufen 1 en essayant de préciser le rôle fonctionnel que joue cette protéine au cours du cycle cellulaire du virus de la rage. D'autre part, je me suis intéressé à d'autres protéines interagissant avec la polymérase rabique qui n'avaient pas encore été étudiées, Dans ce chapitre de ma Thèse, les points précédemment développés sont rappelés pour contextualiser la suite des résultats.

I. Etude de l'interaction de la protéine hStaufen 1 et de la polymérase rabique

A. Cartographie de l'interaction entre la protéine hStaufen 1 et la polymérase rabique par la méthode du double hybride en levure

La cartographie de l'interaction entre la polymérase et la protéine hStaufen 1 a été réalisée par la méthode du double hybride en levure. La « dissection » des deux partenaires a permis d'identifier les régions respectivement responsables de cette interaction. Il a été montré antérieurement que la protéine hStaufen 1 est un partenaire exclusif de la polymérase rabique, à savoir qu'elle n'interagit pas avec les polymérases du virus de la rougeole, du virus respiratoire syncytial (RSV), du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou du virus Sendai. En outre, la polymérase est la seule protéine du virus de la rage à interagir avec la protéine hStaufen 1, les protéines N et P n'en sont pas des partenaires (Cf.fig35.A). Enfin, la région de la polymérase rabique responsable de l'interaction avec la protéine hStaufen 1 est son

extrémité Cterminale, couvrant les 500 derniers acides aminés sans qu'il ait été possible de réduire plus avant ce domaine (Cf.fig35.B). Ce qui suppose que l'intégralité de la séquence est nécessaire à recréer la conformation du domaine d'interaction.

La seconde étape a été d'identifier la région responsable de l'interaction au niveau de la protéine hStaufen 1. Une série de troncations, en Nterminale ou Cterminale, de la protéine hStaufen 1, a permis de démontrer que l'extrémité Cterminale, portant le cinquième domaine de liaison à l'ARN (dsRBD5), est responsable de l'interaction avec la polymérase rabique. Là aussi, la quasi-intégralité de la région est nécessaire, on peut seulement tronquer quelques acides aminés du côté NH2 du domaine mais très vite l'interaction avec la polymérase L est perdue (Cf.fig35.C).

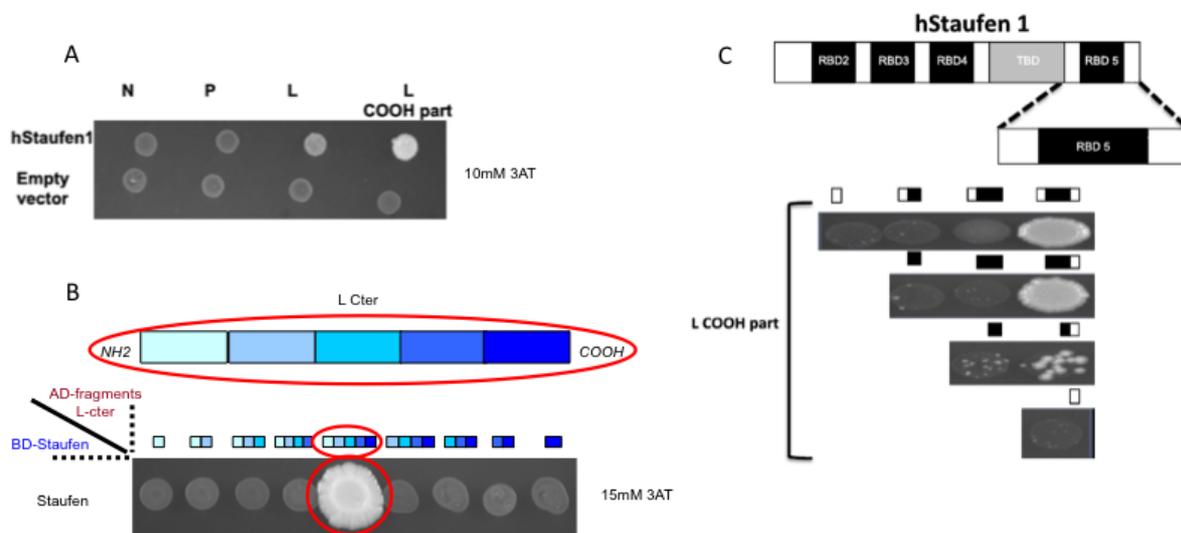


Figure 35 : La protéine hStaufen 1 est un partenaire de la polymérase rabique.

L'interaction se déroule dans des levures transfectées avec les plasmides codant pour la protéine L ou ses domaines (l'appât) et la protéine hStaufen 1 (la proie). Les levures sont cultivées en milieu dépourvu de leucine, de tryptophane et d'histidine. Les deux premières sont amenées par l'un des deux plasmides qui codent les gènes correspondant alors que l'histidine ne peut être exprimée que lors de l'interaction entre les deux partenaires. Ainsi les levures ne peuvent pousser que si les deux protéines sont dans la même levure et qu'elles interagissent entre elle. Le milieu de culture est additionné de 10mM à 15mM de 3AT, inhibiteur compétitif de l'histidine, afin de ne sélectionner que les interactions fortes.

(A) Test de spécificité d'interaction de la protéine hStaufen 1 avec la polymérase rabique et son domaine C-terminal alors que les autres protéines de la RNP (N et P) n'interagissent pas.

(B) Cartographie par délétions progressives du domaine C-terminal de la polymérase rabique montrant que l'intégralité du domaine est requis pour l'interaction avec la protéine hStaufen 1.

(C) Cartographie par délétions progressives du domaine C-terminal de la protéine hStaufen 1 montrant que la quasi(intégralité) du domaine est requise pour l'interaction avec la polymérase rabique.

B. Interaction de la protéine hStaufen 1 et de la polymérase rabique en cellules vivantes

Afin de visualiser d'une autre façon l'interaction entre la protéine hStaufen 1 et la polymérase rabique, des expériences d'immunofluorescence avec des cellules SK-N-SH ont été faites.

Les cellules sont transfectées avec un plasmide permettant l'expression de la polymérase portant un tag GFP en position Nterminale. Ce positionnement du tag laisse espérer qu'il interférera moins ou pas avec l'interaction entre la protéine L et hStaufen 1. En outre, la disposition en Cterminal d'un tag sur une polymérase est plus délétère pour ses activités enzymatiques. La protéine hStaufen 1 endogène est révélée par immunomarquage avec un anticorps anti-hStaufen 1 et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor 647nm (Cf.fig36). Sa localisation est diffuse dans le cytoplasme. En revanche, la polymérase L présente un aspect ponctiforme et certains de ces granules de L colocalisent avec la protéine hStaufen 1, ce qui confirme le résultat préalablement obtenu en levure.

La distribution cytoplasmique de la L dans ce contexte de non infection, c'est à dire en l'absence d'autres protéines virales, nous a permis d'émettre l'hypothèse d'un recrutement de la polymérase dans un compartiment subcellulaire contenant, voire médié par la protéine hStaufen 1. Malgré l'utilisation de marqueurs spécifiques de structures dans lesquelles hStaufen 1 est naturellement présente, comme les granules de stress (G3BP) ou les P-Bodies (XRN1), nous n'avons pas pu identifier à l'heure actuelle de compartiments ou structures responsables de cette distribution.

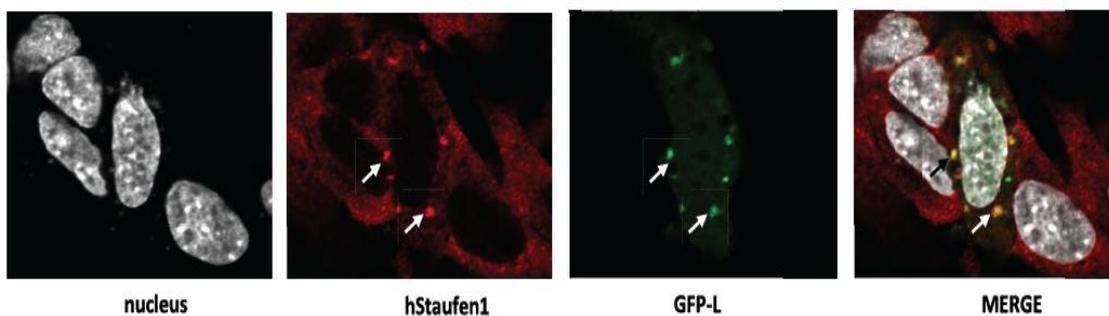


Figure 36 : Colocalisation de la protéine hStaufen 1 et de la GFP-L en cellule SK-N-SH. Les cellules SK-N-SH sont transfectées avec un plasmide codant la GFP-L durant 48h. Les cellules sont ensuite soumises à un immunomarquage anti-hStaufen 1 afin de visualiser la protéine hStaufen 1 endogène. Les noyaux sont colorés par le Hoechst (gris). La polymérase rabique présente un aspect ponctiforme et certains de ces points colocalisent avec la protéine hStaufen 1. La barre d'échelle correspond à 7 μ m.

II. Etude fonctionnelle de l'interaction entre la protéine hStaufen 1 et la polymérase rabique

A. Réorganisation de la protéine hStaufen 1 lors de l'infection rabique

Dans l'objectif de vérifier si l'infection par le virus rabique influait sur l'expression de la protéine hStaufen 1 et/ou sur sa localisation subcellulaire, nous avons visualisé la protéine hStaufen 1 dans des cellules contrôles (non infectées) et infectées durant 24 heures par la souche PV du virus de la rage à MOI 2 afin d'obtenir au moins 80% d'infection.

En l'absence d'infection, la protéine hStaufen 1 est présente dans le cytoplasme sous forme homogène diffuse dans les cellules HEK293T comme dans les cellules SK-N-SH (Cf.fig37). Lors de l'infection des cellules en revanche, il y a une réorganisation de la protéine hStaufen 1 qui se condense à proximité des corps de Negri (CNs), les usines virales où se déroulent la transcription et la réplication du virus et donc l'expression des gènes rabiques. La protéine hStaufen 1 ne semble toutefois pas y pénétrer. Cette réorganisation est visible dans les deux types cellulaires, HEK293T et SK-N-SH, indiquant une propriété générale et non cellule-dépendant.

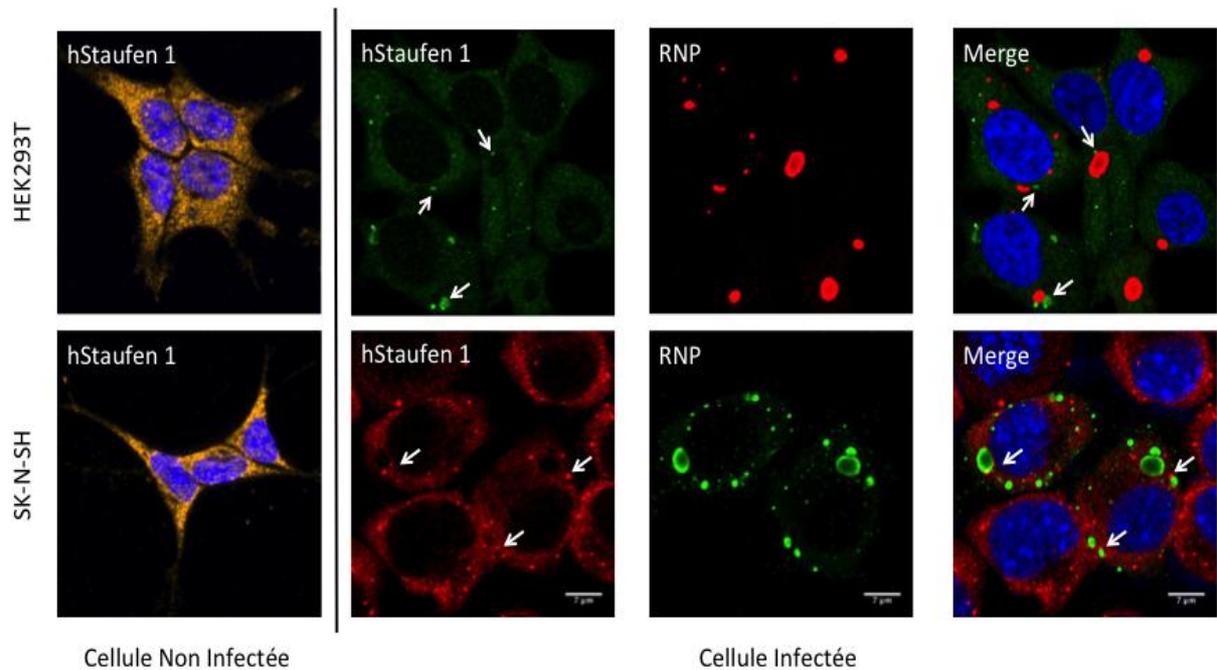


Figure 37 : Réorganisation de la protéine hStaufen 1 à la suite d’une infection rabique.

Les cellules HEK293T et SK-N-SH sont infectées par la souche PV du virus rabique à MOI 2 puis fixées 24 heures post infection. Les RNPs (en vert) et la protéine hStaufen 1 endogène (en rouge) sont révélées par immunomarquage spécifique anti-N et anti-hStaufen1. Les noyaux sont colorés par le Hoechst. La barre d’échelle correspond à 7 μ m.

Les RNPs rabiques se concentrent dans les corps de Négri (CN) et des grains de protéine hStaufen 1 sont à proximité des CN.

La souche virale utilisée généralement durant cette thèse est la souche PV (*Pasteur virus strain*). Afin d’observer si le phénomène ne lui était pas spécifique, nous avons infectées ces mêmes cellules HEK293T et SK-N-SH, avec d’autres souches virales, les souches SAD (*Street Alabama Dufferin*) et CVS (*Challenge Virus Standard*) (Cf.fig38). L’infection avec ces deux souches virales conduit à la formation de corps de Negri dans les deux types cellulaires, tout comme la souche PV. Pour les cellules HEK293T, une réorganisation de la protéine hStaufen 1 est observée pour les deux souches rabiques, bien que le nombre de granules de hStaufen 1 soit plus faible. Pour les cellules SK-N-SH, cette réorganisation de la protéine hStaufen 1 est plus difficile à observer.

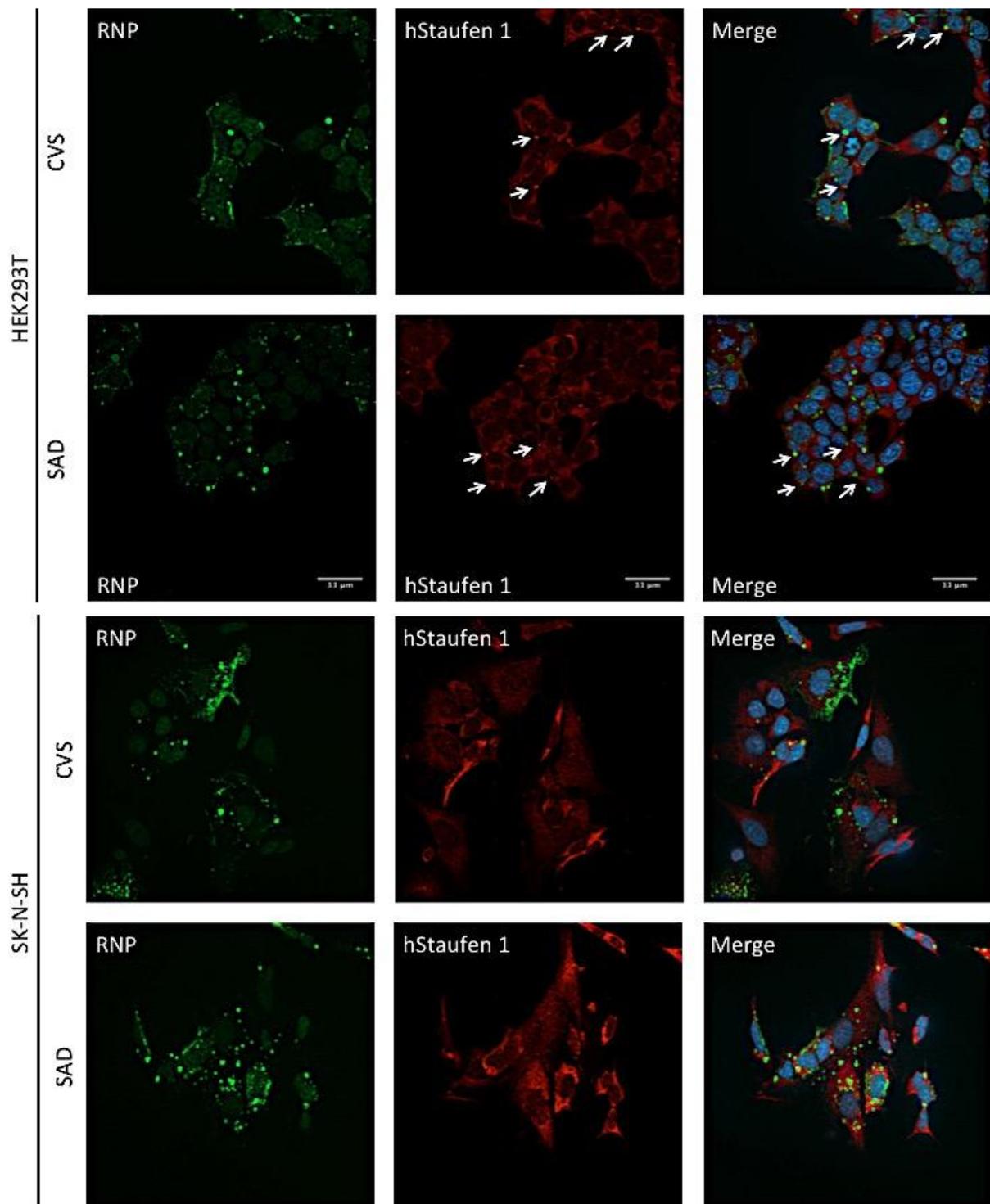


Figure 38 : Détection de la protéine hStaufen 1 après infection par les virus SAD et CVS des cellules HEK293T et SK-N-SH.

Les cellules sont infectées par les souches SAD et CVS du virus rabique à MOI 2 puis fixées 24 heures post infection. Les cellules sont ensuite immunomarquées avec un anti-N (en vert) et un anti-hStaufen 1 (en rouge) pour révéler la RNP et la protéine hStaufen 1 endogène. Les noyaux sont colorés avec le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 11µm.

B. La protéine hStaufen 1 gravite autour des corps de Negri

Les deux premiers résultats nous montrent une colocalisation des protéines hStaufen 1 et polymérase rabique en absence d'infection, ce qui conforte l'observation originale en double hybride, mais aussi une réorganisation de la protéine hStaufen 1 sous forme de granules cytoplasmique après l'infection, à proximité des corps de Negri. Afin de préciser cette observation, nous avons étudié l'effet de l'infection sur la localisation de la GFP-L et son interaction avec la protéine hStaufen 1.

Les cellules SK-N-SH ont été préalablement transfectées avec le plasmide qui code la GFP-L puis infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 2 durant 24 heures. Sur la figure n°39, la polymérase fluorescente (GFP-L) colocalise clairement avec les corps de Negri, caractérisés par l'accumulation des ribonucléoprotéines (RNP) rabique. Il y a donc recrutement de la polymérase avec les autres protéines rabiques au sein des corps de Negri qui constituent une usine virale dans laquelle l'ensemble des réactions enzymatiques rabiques (transcription, réplication) ont lieu (Lahaye, Vidy et al. 2009). Il apparaît donc que dans les conditions d'infection, la polymérase rabique présente une affinité plus grande pour les facteurs viraux et/ou cellulaires présents dans les corps de Negri que pour la protéine hStaufen 1. Cette dernière se réorganise cependant en granule autour du corps de Negri, sans colocalisation stricte avec la polymérase (Cf.fig39.A).

Pour mieux observer cette relation complexe entre la protéine hStaufen 1 et la polymérase rabique au cours de l'infection, une expérience d'imagerie dynamique est réalisée sur des cellules transfectées avec deux plasmides, l'un exprimant la GFP-L, l'autre la mCherry-hStaufen 1. Les cellules sont ensuite infectées et la polymérase GFP-L est recrutée dans le corps de Negri. Il est difficile de présenter une imagerie dynamique dans un manuscrit de Thèse et nous avons fait le choix de montrer une succession d'images prises à temps régulier (Cf.fig39.B). Les images montrent d'une part que la polymérase L est bien captive du corps de Negri, d'autre part que les granules marqués par la protéine hStaufen 1 se déplacent autour du corps de Negri, s'en rapprochent, le contactent puis s'en éloignent de nouveau, sans jamais qu'il y ait fusion entre les deux structures. Cette proximité dynamique entre le corps de Negri et la protéine hStaufen 1, possiblement médiée par la L rabique, démontre une relation plus subtile qu'une simple interaction, avec un mécanisme de compartimentation et d'échange.

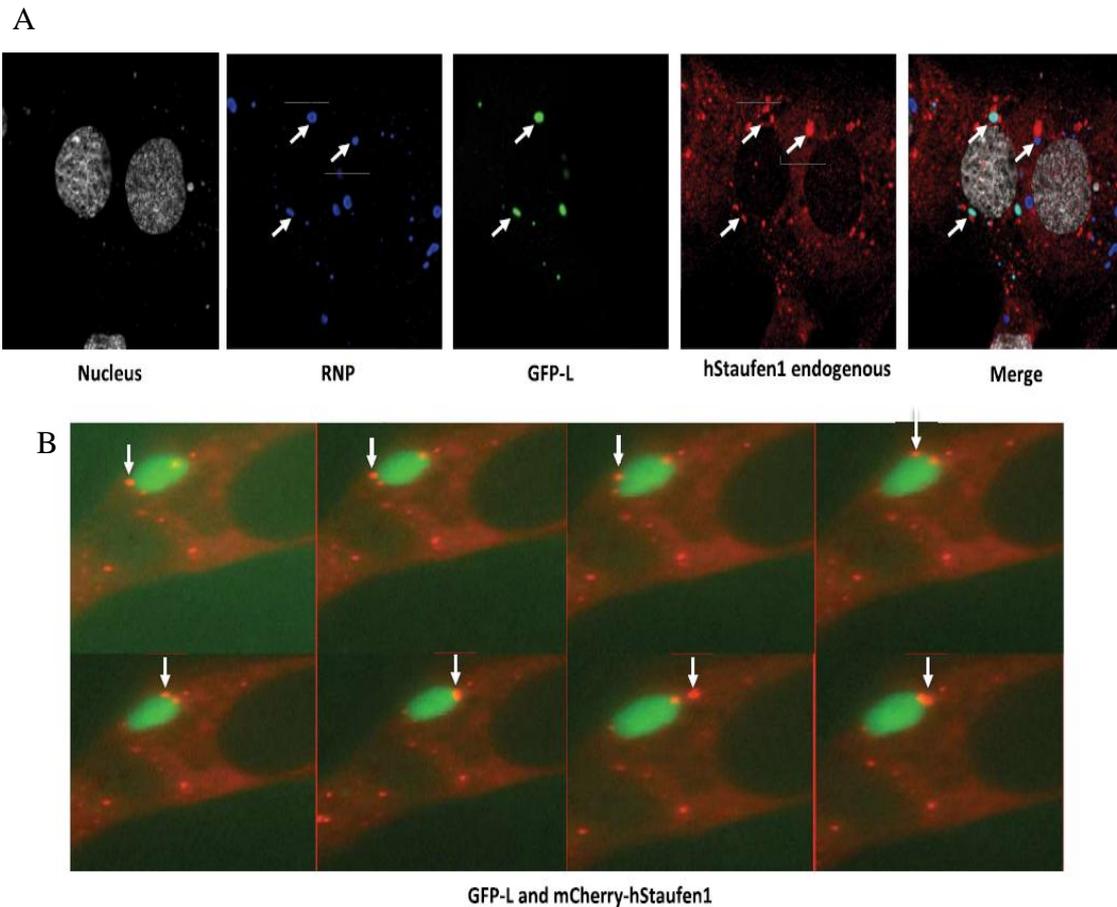


Figure 39 : Les granules de hStaufen 1 sont présent autour des corps de Negri et ont un mouvement satellitaire autour de ces structures.

(A) Les cellules SK-N-SH sont transfectées avec le plasmide codant la GFP-L, puis infectées avec la souche PV du virus de la rage à MOI 2. Les cellules sont ensuite fixées 24 heures post infection puis soumises à immunomarquage anti-N et anti-hStaufen1 pour révéler les RNPs et la protéine hStaufen 1 endogène. Les noyaux sont colorés par le Hoechst (gris). La barre d'échelle correspond à 7 μ m.

(B) Les cellules SK-N-SH sont transfectées avec les plasmides codant la L-GFP et la mCherry-hStaufen 1 puis infectées avec la souche PV du virus de la rage à MOI 2. L'image montre un corps de Negri à fort grossissement gorgé de polymérase L-GFP autout duquel gravite un granule marqué par la protéine hStaufen 1 (rouge).

C. Diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 par shRNA porté par un vecteur lentiviral

Dans le but d'étudier le rôle de la protéine hStaufen 1 dans le cycle répliatif du virus de la rage, nous avons opté pour une diminution d'expression de cette protéine par shRNA porté par un vecteur lentiviral. La vectorisation du shRNA offre plusieurs avantages par

rapport à la transfection de siRNA : (1) le taux de transduction et de transfert de gène est nettement supérieur ; (2) la transduction n'est pas ou peu cytotoxique pour la cellule contrairement aux agents de transfection parfois utilisés ; (3) le vecteur lentiviral permet d'intégrer le shRNA dans le génome de la cellule transduite ce qui maintient la diminution d'expression durant les divisions cellulaires et conduit à l'établissement d'un clone cellulaire transduit de façon stable avec un phénotype d'extinction continu. Il est bon de rappeler ici que mon arrivée dans le laboratoire a précisément correspondu à l'opportunité d'y apporter la technologie d'extinction stable de la protéine hStaufen1 par transduction, une méthode que j'avais apprise durant mon Master 1 dans l'Unité de Pierre Charneau, en collaboration avec le Dr Francesca Di Nunzio. Précisons aussi que le Dr Mohamed Ben Mechlia avait essayé précédemment la transfection de siRNA pour diminuer de manière transitoire l'expression de hStaufen1, avec des résultats difficiles à interpréter à l'époque.

1. Caractérisation des vecteurs

Deux constructions de shRNA ciblant la protéine hStaufen 1 ont été réalisées d'après des séquences publiées ayant montré une efficacité de diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 : Staufen 13546 (stau 46) et Staufen 13548 (stau 48) (Cf. MetM.I.B.1). La première étape a été de contrôler la cytotoxicité des constructions et leur effet sur la viabilité cellulaire après transduction des cellules, afin de valider que l'éventuel effet observé résulte bien de la diminution d'expression de hStaufen 1 et non d'une défaillance cellulaire.

Les conditions de transduction et de temps d'incubation utilisées pour ce test sont les mêmes que celles utilisées pour la suite de l'étude. Les cellules HEK293T ou SK-N-SHensemencées la veille sont transduites avec des MOTs (*Multiplicity of Transduction*) croissantes puis incubées durant 72h à 37°C en atmosphère 5% CO₂. La figure n° 40 montre que la transduction des cellules par les vecteurs contrôles (ne portant pas de transgène shRNA) n'est pas cytotoxique, de même que la transduction avec le vecteur portant le shRNA ciblant hStaufen 1. Ainsi, la transduction et la diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 ne sont pas toxiques pour la cellule. Ce résultat est d'autant plus important qu'il permet d'espérer le clonage de cellules transduites de façon stable et présentant un niveau d'extinction de la protéine hStaufen 1 cohérent avec notre étude.

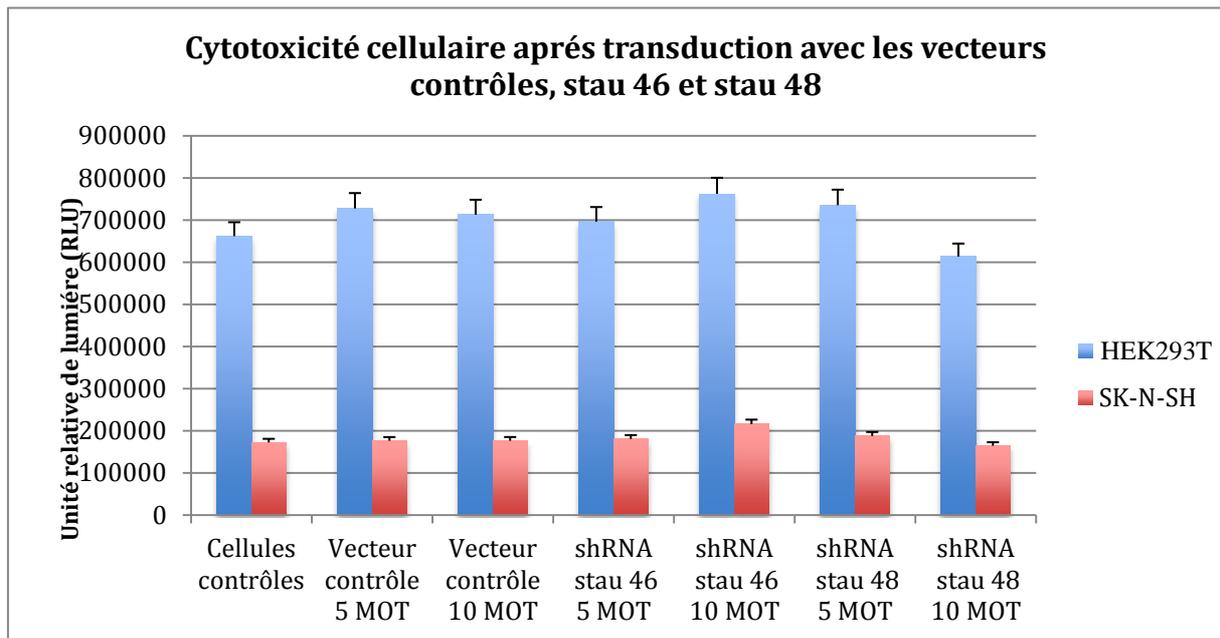


Figure 40 : Cytotoxicité de la transduction des vecteurs lentiviraux contrôles et hStaufen1 en cellules HEK293T et SK-N-SH.

Les cellules HEK293T et SK-N-SH sont transduites avec les vecteurs lentiviraux contrôles (sans shRNA), Stau 46 et Stau 48 (chaque construction portant un shRNA cibant la protéine hStaufen 1 sur différentes régions) à MOT 5 et MOT 10 durant 72 heures. Les cellules sont ensuite traitées selon le protocole du kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) ce qui permet d'observer le relargage d'ATP (Adénosine-Triphosphate).

Nous avons caractérisé le taux de transduction des vecteurs pour connaître le rapport entre le nombre de MOTs appliquées et le pourcentage de cellules transduites. Pour cela, les cellules sont passées au FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*) pour quantifier le signal GFP, notre témoin de transduction. Les résultats montrent que le taux de transduction est au minimum de 60% avec 1 MOT de vecteur, et passe à une valeur plafond de 95% de 5 MOT à 50 MOT (Cf.fig41).

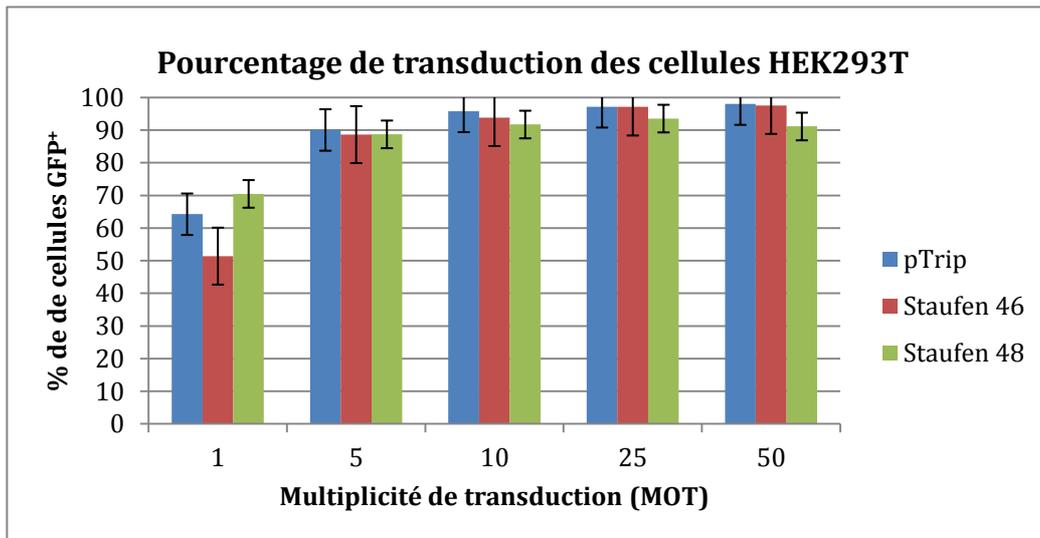


Figure 41 : Pourcentage de transduction des vecteurs contrôles et hStaufen 1 sur cellules HEK293T.

Les cellules HEK293T sont transduites avec des MOTs croissantes (de 1 à 50 MOTs) de vecteurs contrôles (pTrip), ou codant les shRNA Staufen 46 et Staufen 48. Les cellules sont ensuite fixées avec du CellFix 72 heures post transduction puis analysées par FACS pour quantification du signal GFP, contrôle de transduction.

A la suite de ces deux contrôles, l'efficacité des lentivirus exprimant les shRNA Stau 46 ou Stau 48 a diminué l'expression de la protéine hStaufen 1, qui a été évaluée. Pour cela, les cellules HEK293T et SK-N-SH sont transduites comme précédemment puis lysées pour la réalisation du western blot ou fixées pour l'immunofluorescence.

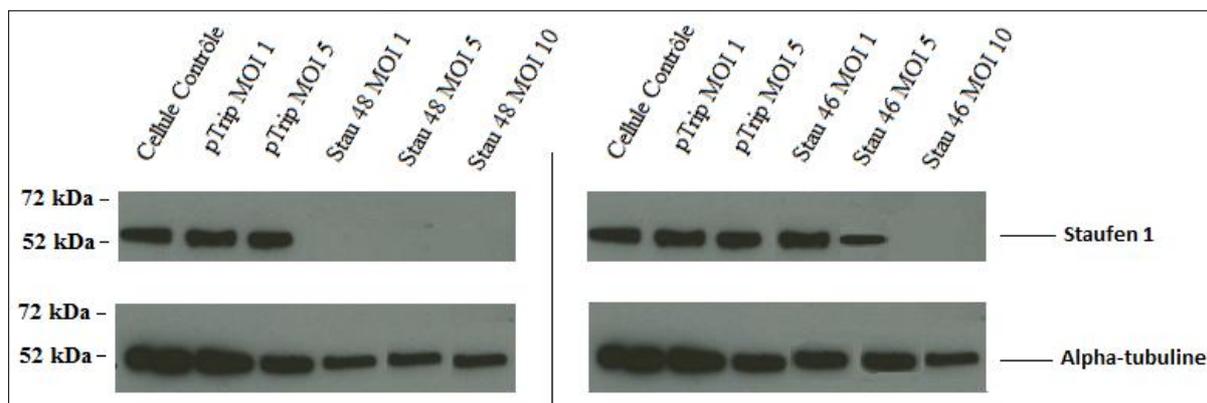


Figure 42 : Détermination de l'efficacité de diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 par les constructions Stau 46 et 48.

Les cellules sont transduites avec des MOTs croissantes (1, 5 et 10 MOT) de vecteurs contrôles (pTrip), ou codant les shRNA Staufen 46 (panel de droite) et Staufen 48 (panel de gauche). A 72h post transduction des extraits cellulaires sont réalisés et analysés par western blot avec un anti-hStaufen 1 et un anti- α tubuline.

La figure n° 42 montre que la construction pTrip, qui constitue notre contrôle, n'a aucun effet alors que la transduction de la construction stau 48 conduit à l'absence de détection de la protéine hStaufen 1 dès 1 MOT. Pour la construction stau 46, l'effet est plus modéré, l'absence de détection n'apparaissant que lors de la transduction de 10 MOTs.

Cette diminution d'expression a également été validée par immunofluorescence (Cf.fig43). 72 heures après la transduction les cellules HEK293T et SK-N-SH sont fixées puis immunomarquées avec un anticorps anti-Staufen 1. La figure n°43 ne montre que les résultats des cellules transduites avec la construction stau 48, la plus efficace. De manière cohérente, une absence d'immunodétection de hStaufen 1 est observée

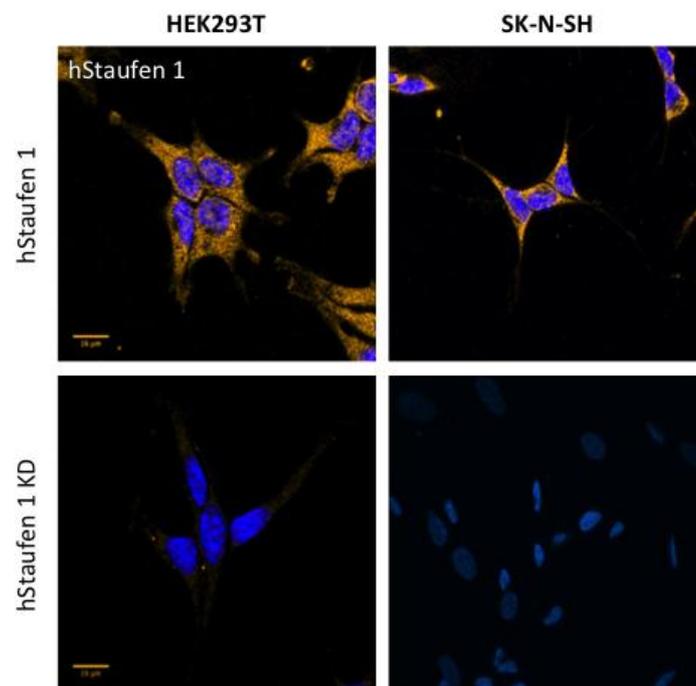


Figure 43 : Caractérisation par immunofluorescence de la diminution d'expression de hStaufen 1 en cellules HEK293T et SK-N-SH.

Les cellules hStaufen 1 KD sont transduites avec le vecteur Stau 48, fixées 72 heures post transduction et immunomarquées avec un anticorps anti-hStaufen 1. Les noyaux sont marqués au Hoechst.

La barre d'échelle correspond à 15μm.

Forts de ces résultats nous avons établi des clones cellulaires exprimant de façon stable le shRNA et maintenant au cours des passages une diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 caractérisée par une absence de détection en Western Blot et immunofluorescence. Pour cela des cellules HEK293T et SK-N-SH ont été transduites avec le

vecteur stau 48 à 5 MOT, permettant d'optimiser le nombre de cellules transduites et d'obtenir le meilleur profil d'extinction grâce à un nombre d'intégrations raisonnables du shRNA pour ne pas trop perturber la cellule. Seules les cellules HEK293T ont permis la sélection de quatre clones présentant une diminution stable de la protéine hStaufen 1 durant plusieurs passages. Les SK-N-SH étant d'un naturel grégaire, elles n'ont pas supporté la dilution extrême d'une cellule par puits et aucun clone cellulaire stable n'a pu être obtenu. Ainsi, dans la suite du projet, les résultats obtenus avec les cellules HEK293T sont ceux issus d'un clone cellulaire, tandis que pour les cellules SK-N-SH, il s'agit d'une population cellulaire avec un profil de transduction hétérogène.

2. Effet de la diminution d'expression de hStaufen 1 sur l'infection rabique

Nous avons par la suite contrôlé l'effet de la diminution d'expression de hStaufen 1 sur l'infectivité des cellules afin de mieux comprendre son rôle durant l'infection rabique. Les cellules HEK293T et SK-N-SH sont infectées par la souche PV du virus rabique à 1 MOI durant 20 heures. Ce temps correspond à un seul cycle viral pour éviter une réinfection des cellules par le virus néosynthétisé. Les cellules sont ensuite fixées puis immunomarquées avec un anticorps anti-N (FDI) pour quantifier les corps de Negri.

La figure n°44 nous montre que la transduction des cellules par un vecteur contrôle ne perturbe pas leur infection. De même, la diminution d'expression de hStaufen 1 n'impacte ni l'infection, ni la mise en place du/des corps de Negri primaires. Ce résultat tend à montrer que la protéine hStaufen 1 n'intervient pas dans les étapes précoces d'infection et de mise en place du(es) corps de Negri primaire(s).

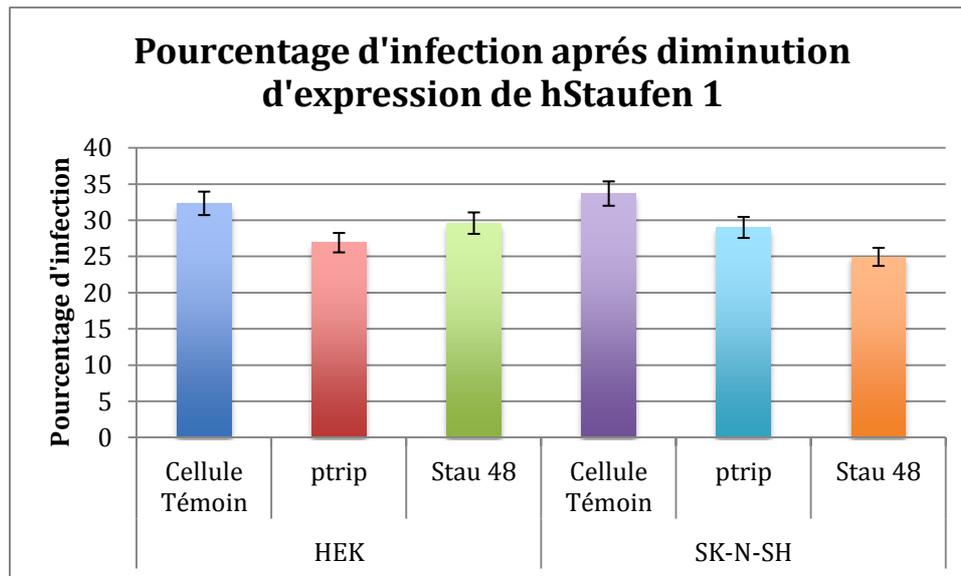


Figure 44 : La diminution d'expression de hStaufen 1 n'impacte pas la susceptibilité des cellules HEK293T ou SK-N-SH à l'infection par le virus de la rage.

Les cellules normales ou transduites de manière stable (clones HEK293T) ou transitoires (SK-N-SH) par les vecteurs pTrip (contôle) ou Stau 48, sont infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 1. Elles sont fixées 20 heures post infection puis immunomarquées avec un anti-RNP couplé à la FITC. Celui-ci permet de révéler les Corps de Negri, inclusions cytoplasmiques vertes qui sont ensuite quantifiées selon un protocole de la plateforme d'imagerie IP pour évaluer le pourcentage de cellules infectées .

3. Effet de la diminution d'expression de hStaufen 1 sur l'expression des RNPs intracellulaires

Pour évaluer l'effet de la diminution d'expression de hStaufen 1 sur l'expression intracellulaire des protéines rabiques, les cellules HEK293T et SK-N-SH non transduites ou transduites avec le vecteur contrôle (pTrip) et stau 48, sont infectées durant 24h. Elles sont ensuite lysées pour analyser par western blot les protéines rabiques (Cf.fig45).

Le clone cellulaire HEK293T transduit avec le shRNA-Stau48 présente une diminution d'expression significative de la protéine hStaufen 1, sous le seuil de détection en Western Blot. En utilisant un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la RNP totale, capable de reconnaître la N et les différentes isoformes de la P, l'extinction de hStaufen 1 provoque une légère augmentation de ces protéines virales. Alors qu'une seule bande est observée dans les conditions contrôles, il y en a trois pour le clone HEK293T/stau. Ce profil pouvant indiquer une dégradation de la N ou une accumulation d'isoformes de la P, nous

avons utilisé un anticorps spécifique de la protéine P qui nous a permis de valider la seconde hypothèse. Ainsi, la diminution d'expression de hStaufen 1 conduit à une augmentation de la quantité intracellulaire de la protéine P et de façon moindre de la N (bande supérieure). De façon encore plus convaincante, la diminution d'expression de hStaufen 1 s'accompagne d'une augmentation de la polymérase qui devient détectable alors qu'elle ne l'était pas dans les conditions contrôles, un résultat qui remet en lumière le lien qu'il peut y avoir entre la L et la protéine hStaufen 1.

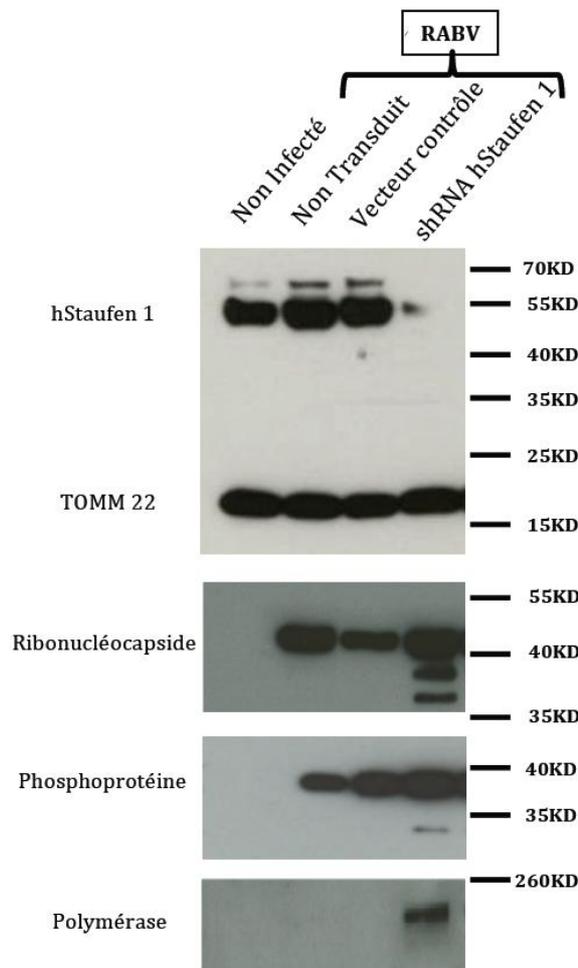


Figure 45 : La diminution d'expression de hStaufen 1 conduit à l'augmentation de la quantité de protéines virales intracellulaires.

Les cellules HEK293T non transduites, transduites avec un vecteur vide (contrôle) ou les clones hStaufen 1⁻ sont infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 2. 24 heures post infection des extraits cellulaires sont réalisés et analysés par western blot avec un anti-hStaufen 1, un anti-TOMM22, un anti-RNP, un anti-P et un anti-L.

En utilisant la méthode Elisa, une quantification des RNPs intracellulaires a été réalisée (Cf.fig46). Une quantité similaire de RNPs intracellulaires est observée dans les deux conditions contrôles (cellules normales ou transduites par pTrip) alors que la diminution d'expression de hStaufen 1 conduit à augmenter d'un facteur trois la quantité des RNPs intracellulaires. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Western Blot et indique que la protéine hStaufen 1 influe sur la quantité intracellulaire des RNPs lors d'une infection rabique.

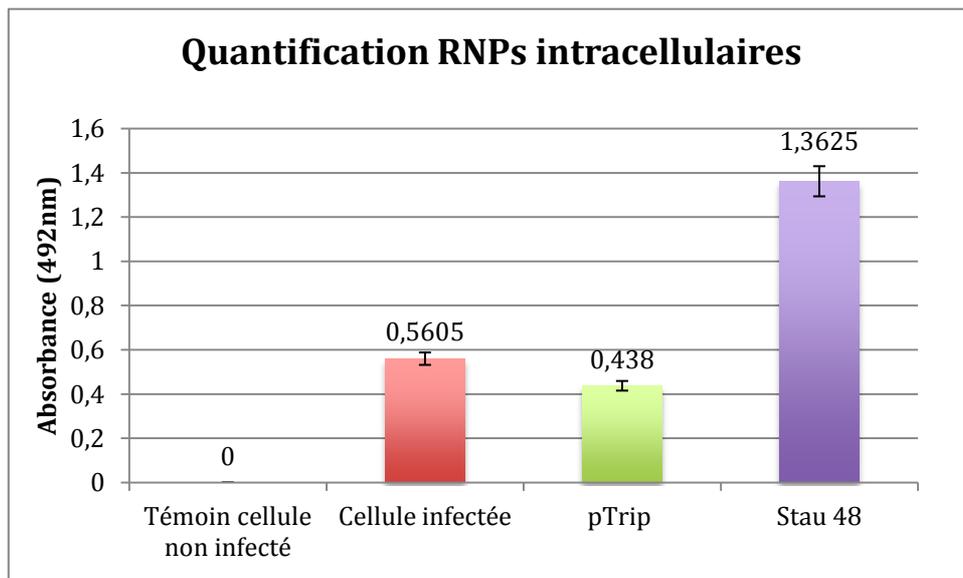


Figure 46 : Quantification des RNPs intracellulaires après diminution d'expression de hStaufen 1 par Elisa

Les cellules HEK293T et SK-N-SH sont infectées avec le virus PV à MOI 2. A 24h post infection, des extraits cellulaires sont réalisés et analysés par Elisa pour quantifier la RNP.

4. La protéine hStaufen 1 intervient dans le développement des corps de Negri secondaires

Si la protéine hStaufen 1 n'intervient pas dans l'étape d'infection cellulaire, sa diminution d'expression semble réguler positivement la quantité des protéines virales intracellulaires (Cf.fig45). Le virus rabique réalise l'ensemble de ses synthèses dans les corps de Negri, qui sont des structures dynamiques au cours de l'infection. Elles apparaissent sous une forme unique ou de deux copies dans les étapes précoces de l'infection, les corps de Negri primaires. Elles se dispersent ensuite au cours de l'infection en multiples autres inclusions, les corps de Negri secondaires. Nous avons voulu observer l'effet de la diminution

d'expression de la protéine hStaufen 1 sur la mise en place de ces corps de Negri, primaires et secondaires.

Pour cela, des cellules ont été fixées à différents temps post-infection afin de visualiser la dynamique de formation/dispersion des corps de Negri en présence ou non de la protéine hStaufen 1 (Cf.fig47). Seul le clone cellulaire HEK293T/stau⁻ a été utilisé pour se soustraire de l'hétérogénéité phénotypique d'une population cellulaire transduite. La protéine hStaufen 1 est révélée par l'anticorps secondaire AlexaFluor 555nm (orange) et les RNPs par un anticorps couplé au FITC (vert). La figure n°47 montre la dynamique des corps de Negri au cours de l'infection.

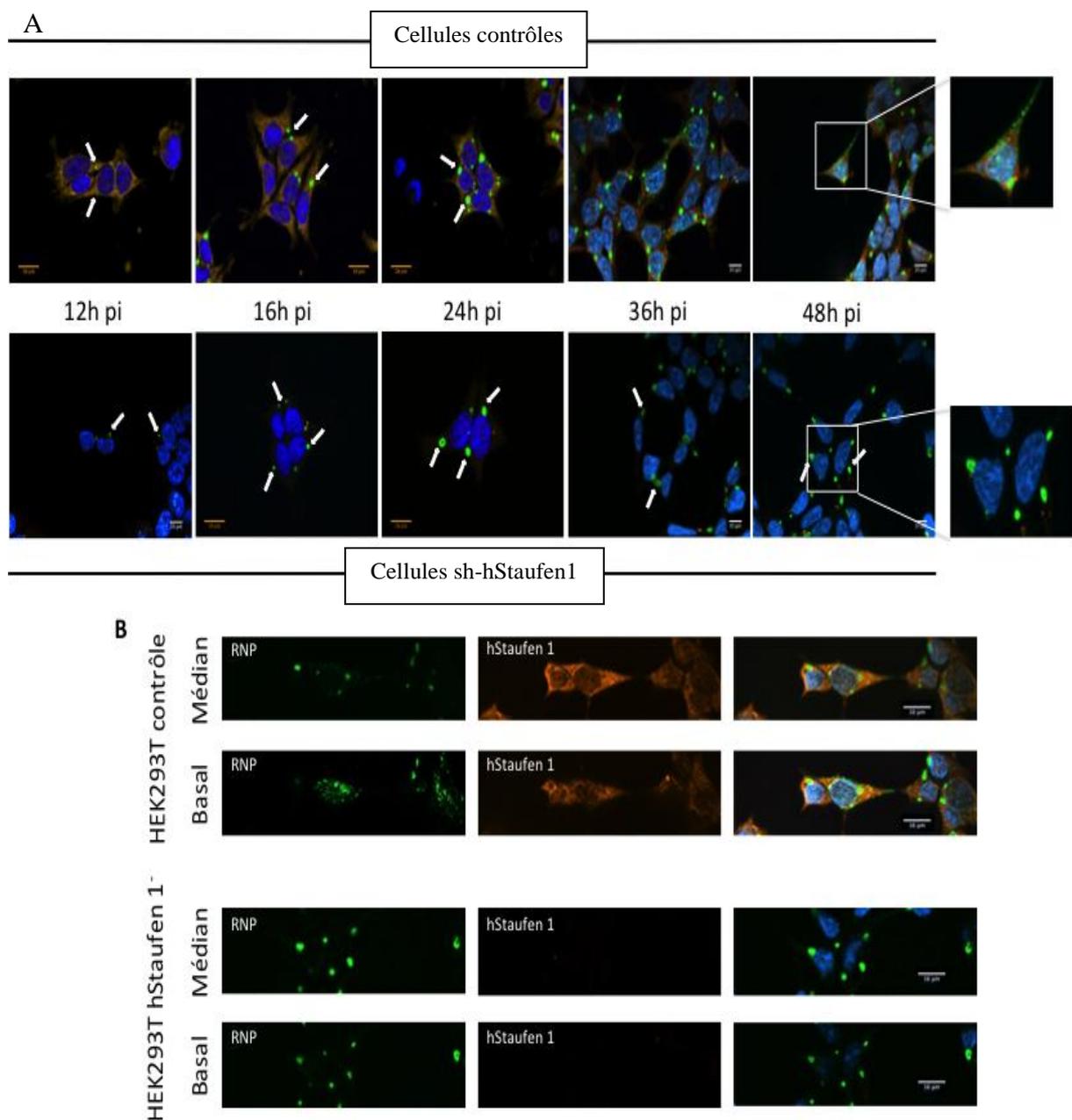


Figure 47 : La diminution d'expression de hStaufen 1 bloque la formation des corps de Negri secondaires et la dissémination intracellulaire des RNPs

Les cellules HEK293T contrôles et les clones hStaufen 1⁻ sont infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 2, fixées puis immunomarquées avec un anticorps anti-N pour visualiser les Corps de Negri et un anti-hStaufen 1 pour visualiser la protéine hStaufen 1 endogène. Les noyaux sont marqués avec le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 16 µm.

(A) Cellules HEK293T contrôles et clones hStaufen 1⁻ fixées à 12h, 16h, 24h, 36h et 48h post infection.

(B) Deux plans focaux (Basal et Médian) de cellules HEK293T contrôles et clones hStaufen 1⁻ fixées à 48h post infection. Le plan médian correspond au milieu de la cellule où les CNs primaires et secondaires sont répartis. Le plan basal correspond à la partie sous membranaire de la cellule où les NCs sont adressés pour le bourgeonnement et la production de néo-particules.

Durant la phase précoce de l'infection (12-16h pi), la mise en place et le développement des corps de Negri primaires est la même dans la cellule contrôle et le clone hStaufen 1⁻. Ce résultat confirme celui obtenu antérieurement montrant que la diminution d'expression de hStaufen 1 ne perturbe pas l'infektivité des cellules (Cf.fig44). Ainsi l'établissement du/des corps de Negri primaire(s) est indépendant de la protéine hStaufen 1.

Des différences apparaissent durant la phase intermédiaire, à partir de 24 heures pi. Dans les cellules contrôles apparaissent, en plus des corps de Negri primaires, plusieurs inclusions cytoplasmiques de plus petites tailles : les corps de Negri secondaires qui poursuivent leur formation et augmentent en nombre jusqu'à 36h. Durant la phase tardive (48h), un marquage membranaire des RNPs, indique l'entrée dans l'étape de bourgeonnement viral. Ce phénomène de dissémination intracellulaire active du virus jusqu'à son bourgeonnement à la membrane plasmique est absent des cellules sh-hStaufen1 qui montrent une incapacité des corps de Negri à se disséminer dans le cytoplasme mais au contraire à grossir. Ainsi la protéine hStaufen 1 semble nécessaire à l'établissement des corps de Negri secondaires et au transport intracellulaire des protéines virales néosynthétisées jusqu'aux sites de bourgeonnement. Notons à ce stade que ces deux événements sont « microtubules dépendant » et qu'il est connu que hStaufen 1 a la capacité de se lier à la tubuline grâce à son domaine TBD.

5. La protéine hStaufen 1 et l'activité de la polymérase rabique

Le lien physique entre la protéine hStaufen 1 et la polymérase rabique peut indiquer un rôle régulateur dans les activités enzymatiques de la polymérase. Pour tester cette hypothèse,

nous avons utilisé un système minimum de réplication appelé minireplicon disponible au laboratoire. Un clone cellulaire de HEK293T/T7 exprimant la polymérase T7 est transfecté par cinq plasmides pour reconstituer un système minigénome rabique actif en transcription et réplication : (1) trois plasmides expriment les protéines N, P, L, sous contrôle du promoteur T7 qui constituent le complexe RNP minimum, (2) un plasmide code la luciférase sous contrôle du promoteur rabique qui permet de rapporter l'activité du complexe RNP ; (3) un plasmide code la rénillia sous contrôle du promoteur T7. Les cellules sont préalablement transduites durant 72h avec 5 MOT de vecteur pTrip vide (contrôle) ou codant le shRNA-hStaufen 1 puis transfectées avec les plasmides précédents. Elles sont ensuite lysées puis quantifiées pour les signaux luciférase et rénillia.

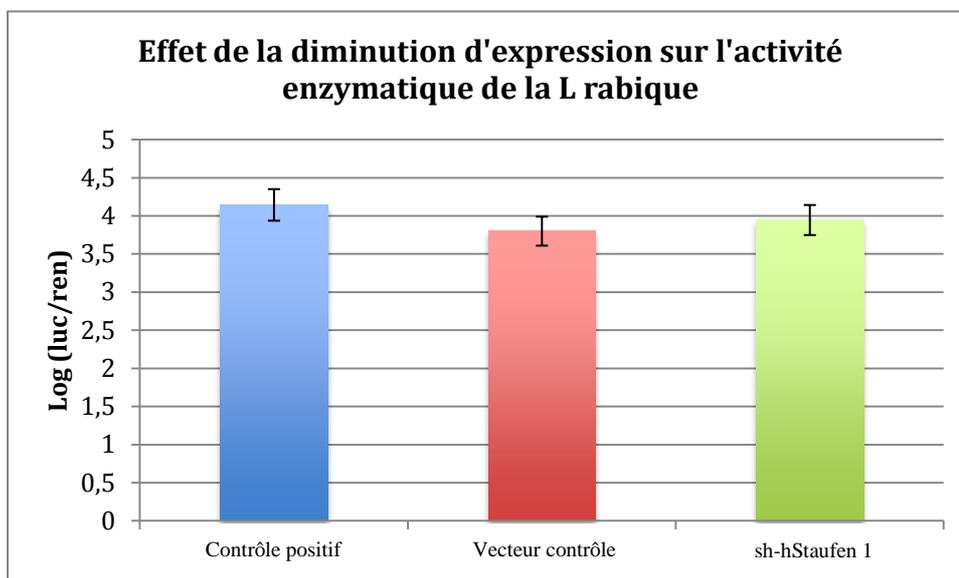


Figure 48 : La diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 n'impacte pas les activités de transcription et de réplication de la polymérase rabique

Les cellules HEK293T/T7 sont non transduites ou transduites avec les vecteurs pTrip (contrôle) ou codant stau 48 à MOT 5. 72 heures post transduction, les cellules sont transfectées avec les plasmides pN, pP, pL, pLuciférase et pRénillia. 48 heures post transfection des extraits cellulaires sont analysés par luminescence selon le protocole du kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega).

Les résultats nous indiquent que la transduction d'un vecteur contrôle ne perturbe pas plus l'activité de la polymérase rabique que le vecteur produisant la diminution d'expression de la protéine hStaufen 1. Ceci suggère que hStaufen 1 n'est pas impliquée dans un mécanisme de régulation de l'activité de transcription/réplication de la polymérase.

Ce modèle ne permet pas de dissocier la transcription de la réplication, qui par un effet d'enrichissement, augmente le matériel pour la transcription. Afin de dissocier ces deux étapes, une RT-QPCR spécifique des ARNm viraux, produit de la transcription, et de l'antigénome, produit de la réplication est en cours de développement.

6. La protéine hStaufen 1 et la production des particules virales

Il est décrit que la protéine hStaufen 1 joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la production des particules virales pour le VIH et le virus Influenza (cf.Introduction.II.A.12). Nous avons donc étudié l'impact de la diminution de la protéine hStaufen 1 sur la production des particules virales rabiques.

Les particules infectieuses produites dans le surnageant de cellules infectées ont été quantifiées grâce à une gamme de dilution décroissante déposée sur un tapis de cellules BSR. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont fixées puis immunomarquées avec un anticorps anti-N afin de quantifier les corps de Negri (Cf.fig49).

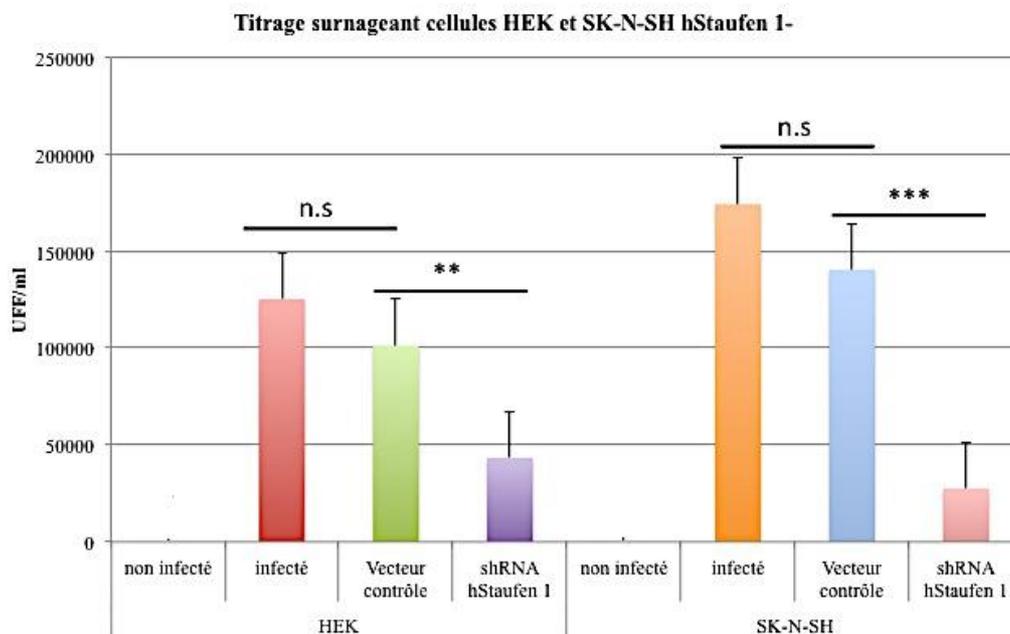


Figure 49 : Le surnageant des cellules diminuées en leur expression de hStaufen 1 est moins infectieux

Les cellules HEK293T et SK-N-SH sont infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 2. 24 heures post infection le surnageant des cellules est déposé sur un tapis de cellule BSR en dilution croissante de raison 3. Les cellules sont fixées 24 heures post infection puis immunomarquées avec un anti-N afin de visualiser les CNs pour les quantifier et déterminer le titre infectieux (n.s : non statistique, $p < 0,001 = \ll ** \gg$, $p < 0,0001 = \ll *** \gg$).

Il apparaît que la transduction des cellules par le vecteur contrôle (pTrip) ne perturbe pas ou peu la production de particules virales infectieuses par rapport aux cellules contrôles. En revanche, il est clairement visible que la diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 impacte négativement cette production, à un niveau de 60% pour les cellules HEK293T, jusqu'à 80% pour les cellules SK-N-SH. Cette différence plus forte pour les SK-N-SH s'explique probablement par le fait que le surnageant provient d'une population cellulaire transduite de façon hétérogène et non d'un clone hStaufen 1⁻ stable. Ainsi, la diminution d'expression de hStaufen 1 réduit le nombre de particules infectieuses libérées dans le surnageant et cet effet dépend du niveau de répression de la protéine hStaufen 1.

Afin d'évaluer si cette réduction d'infectivité était due à une diminution de la quantité des particules virales infectieuses relarguées dans le surnageant ou à une perte d'infectivité de ces particules (mutations, etc), nous avons réalisé une extraction des ARN viraux du surnageant des cellules HEK293T et SK-N-SH. Puis, l'ARN génomique, de polarité négative a été spécifiquement rétrotranscrit en ADNc en utilisant une amorce spécifique de sens positif (Cf.MetM.II.H). De même, l'ARN antigénomique, de polarité positive a été spécifiquement rétrotranscrit en ADNc en utilisant une amorce spécifique de sens négatif sur la région intergénique G/L. L'ADNc obtenu a ensuite été utilisé comme matrice pour la qPCR afin de quantifier l'ARN négatif génomique (Cf.fig50).

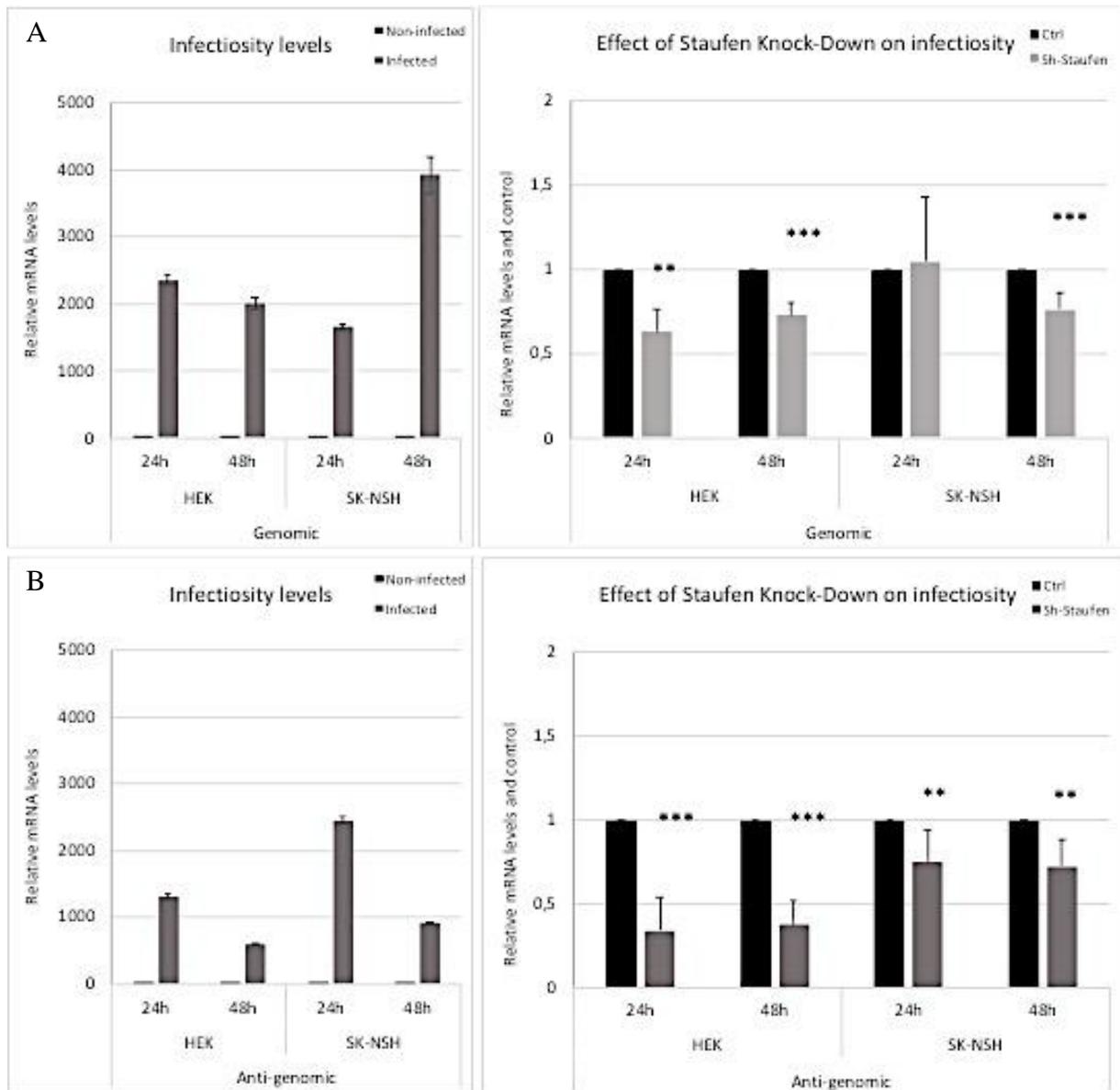


Figure 50 : Quantification de l'ARN génomique et anti-génomique relargués dans le surnageant de cellules HEK293T et SK-N-SH hStaufen 1

Les cellules HEK293T et SK-N-SH contrôles, transduites avec le vecteur pTrip (Contrôle=Ctrl), et transduites avec le vecteur shRNA-hStaufen 1 (Sh-Staufen) sont infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 2. 24 heures et 48 heures pi, les surnageants sont purifiés afin d'y extraire les ARNs viraux (Cf.MetM). Les ARNs sont ensuite rétrotranscrits avec un primer spécifique soit du génome (A) ou de l'anti-génome (B). L'ADNc obtenu est analysé par QPCR puis les résultats sont relativisés avec le gène de ménage RLP0.

Les résultats sont cohérents avec ceux du titrage ; le vecteur contrôle ne perturbe pas la quantité des particules virales (génomme négatif) relarguées dans le surnageant. En revanche, la diminution d'expression de hStaufen 1 entraîne une réduction d'environ 50% de la quantification des particules virales dans les cellules HEK293T comme dans les cellules SK-N-SH. Il en va de même pour le relarguage de particules virales contenant l'ARN anti-génomique, pour lequel il a été montré un relarguage dans le surnageant équivalent à l'ARN génomique. Ces résultats montrent que la protéine hStaufen 1 joue un rôle dans la production des particules virales, infectieuses et non-infectieuses, vraisemblablement par routage des néo-RNPs depuis les corps de Negri vers le site de bourgeonnement.

III. Détournement de la protéine hStaufen 1 par le virus rabique

A. La protéine hStaufen 1 est encapsidée dans la particule virale rabique

L'analyse de la structure de la polymérase rabique seule ou en complexe avec le complexe RNP n'est pas encore possible, en raison des limitations technologiques et de production. Cette difficulté est partagée par l'ensemble des virus à ARN négatif et c'est aujourd'hui la cryomicroscopie électronique qui produit les informations les plus pertinentes (Liang, Li et al. 2015). Il est donc impossible pour le moment d'observer l'organisation de ce complexe en activité et notamment la conformation de la polymérase. Ces informations pourraient expliquer l'interaction avec la protéine hStaufen 1 et son rôle dans le cycle rabique. Cependant, les résultats obtenus précédemment sur le rôle de hStaufen 1 dans le cycle répliatif rabique présentent de nombreuses similitudes avec ceux décrit pour le VIH. Pour ce virus, la protéine hStaufen 1 est requise pour la production et le bourgeonnement des particules virales, et hStaufen 1 est retrouvée dans le virion. Nous avons voulu contrôler la présence de la protéine hStaufen 1 dans le virus de la rage afin d'appuyer d'avantage la thèse du rôle de cette protéine dans la production des particules virales et du lien physique entre hStaufen 1 et la polymérase.

Pour cela, deux productions virales à large échelle sont faites en cellules HEK293T et SK-N-SH durant 96 heures. Les surnageants ont été clarifiés, concentrés et purifiés sur gradient de saccharose (Cf.MetM.III.J) afin de purifier les particules virales. En parallèle, le surnageant de cellules non infectées est traité de la même façon afin de constituer un contrôle négatif. Ces fractions sont ensuite analysées par western blot (Cf.fig51) pour détecter les protéines virales, la protéine hStaufen 1 et une protéine cellulaire décrite comme encapsidée dans le virus rabique : la protéine Hsp70 (Lahaye, Vidy et al. 2012).

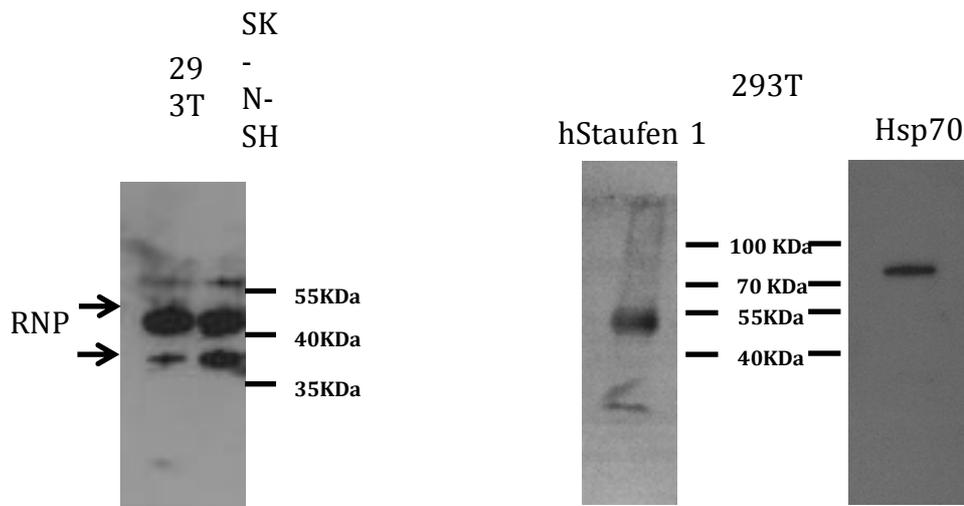


Figure 51 : La protéine hStaufen 1 est encapsidée dans le virion rabique

Les cellules HEK293T et SK-N-SH sont infectées avec la souche PV du virus de la rage à MOI 0,1. A 96h post-infection les surnageants sont clarifiés puis concentrés par ultracentrifugation. Les culots viraux sont purifiés sur gradient de saccharose 25-50% puis la bande correspondant au virus complet est reprise dans du tampon NT. Cet échantillon est lysé puis analysé par Western blot avec des anticorps anti-RNP, anti-hStaufen 1 et anti-Hsp70.

La figure n°51 montre que les protéines de la RNP sont détectées dans les fractions issues des surnageants de cellules HEK293T et SK-N-SH infectées. En outre, la protéine Hsp70, préalablement décrite comme présente dans la particule virale rabique (Lahaye, Vidy et al. 2012) est retrouvée dans les fractions purifiées et non dans un surnageant cellulaire non infecté (non montré). Ceci confirme que les fractions purifiées correspondent bien à du virus complet. De manière intéressante, la protéine hStaufen 1 est également détectée dans les particules virales purifiées du surnageant des cellules HEK293T. Toutefois, cette détection nécessite un dépôt important de protéines totales (90µg), qui rend la détection très difficile dans la fraction virale des SK-N-SH en raison d'une concentration trop faible des protéines.

Cette observation renforce l'hypothèse que hStaufen 1 doit être encapsidée dans la particule via son interaction avec la polymérase, qui n'est elle-même estimée qu'à 50 molécules par virus. Ainsi, la faible représentativité de la protéine hStaufen 1 peut être directement dépendante de la quantité de polymérase encapsidée. Il n'a pas été possible de co-détecter la polymérase afin de vérifier cette relation dose dépendante en raison d'un épuisement du stock de l'anticorps spécifique anti-L produit dans l'Unité.

B. La protéine hStaufen 1 est présente dans les granules de stress viraux induits

La protéine hStaufen 1 est décrite comme étant un composant non essentiel des granules de stress (Cf.Introduction.II.A.11). Ces structures se forment en réponse à un stress et concentrent un ensemble de protéines et d'ARNs non essentiels à la réponse au stress et qui voient ainsi leur traduction réprimée. La protéine hStaufen 1, avec sa capacité de liaison aux ARNs, joue le rôle de transporteur de ces ARNs vers les granules de stress. La protéine hStaufen 1 est donc un constituant de ces granules, au même titre que les protéines G3BP, PABP ou TIA-1, qui sont des marqueurs bien décrits de ces structures.

Récemment, il a été démontré que le virus de la rage a la capacité d'induire la formation de granules de stress (Nikolic, Civas et al. 2016). Il est décrit que la plupart des ARNm viraux transitent des corps de Negri vers ces granules de stress. Les images présentées dans cette étude se rapprochant de celles que nous avons observées de hStaufen 1 lors d'une infection rabique, nous avons cherché à savoir si hStaufen 1 pouvait être impliquée dans la formation des granules de stress.

Dans les cellules HEK293T et SK-N-SH non infectées, la protéine hStaufen 1 et la protéine G3BP, comme marqueur des granules de stress, sont présentes dans l'ensemble du cytoplasme de façon diffuse (Cf.fig52). Il n'y a pas à proprement parler de colocalisation mais de localisation similaire des deux protéines.

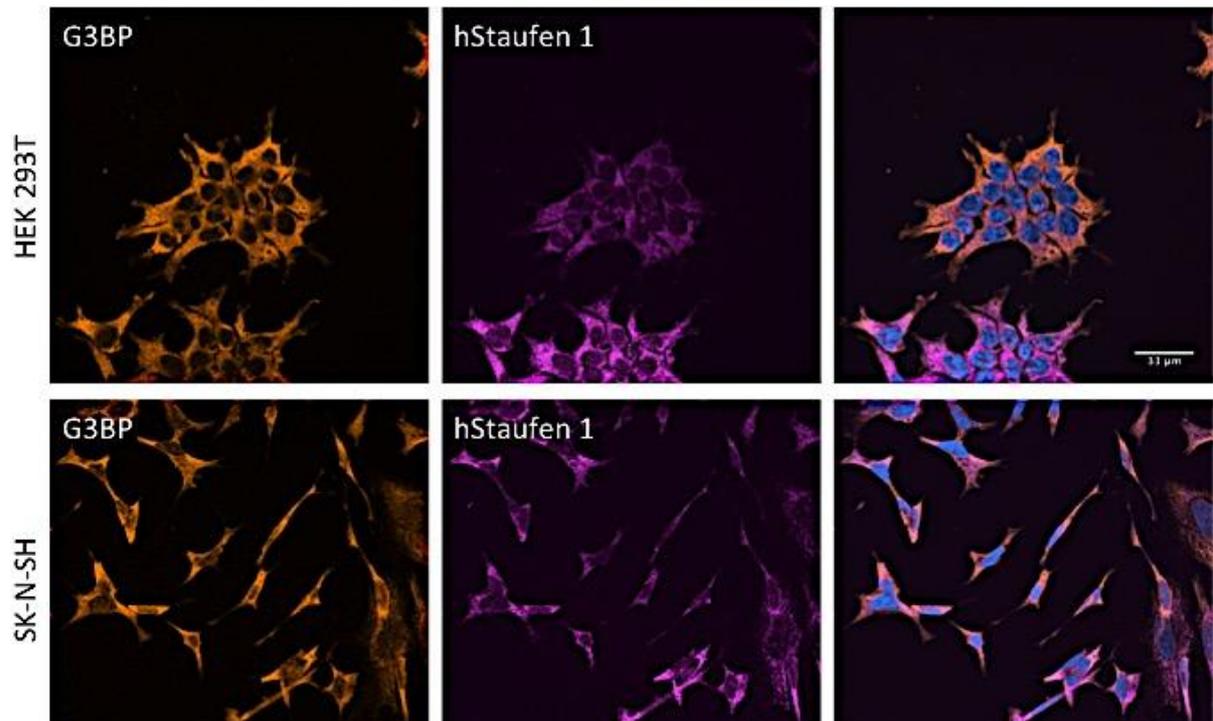


Figure 52 : Les protéines hStaufen 1 et G3BP ont une localisation cytoplasmique mais ne colocalisent pas

Les cellules HEK293T ou SK-N-SH sont fixées et immunomarquées avec un anti-G3BP et un anti-hStaufen 1 afin de visualiser les protéines endogènes correspondantes. Les noyaux sont colorés par le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 11µm.

Comme il a été décrit que la diminution d'expression de hStaufen 1 induit la formation de granules de stress, en absence de stress (Thomas, Martinez Tosar et al. 2009), nous avons vérifié si tel était le cas dans les modèles cellulaires transduits par le vecteur shRNA stau48 de façon stable (clone cellulaire, HEK293T) ou transitoire (SK-N-SH). La figure n°53 montre qu'il n'y a pas de changements morphologiques, ni de réarrangements de la protéine G3BP lors de la diminution d'expression de la protéine hStaufen 1. G3BP est présente de façon diffuse dans l'ensemble du cytoplasme contrairement à ce qui est décrit dans la littérature.

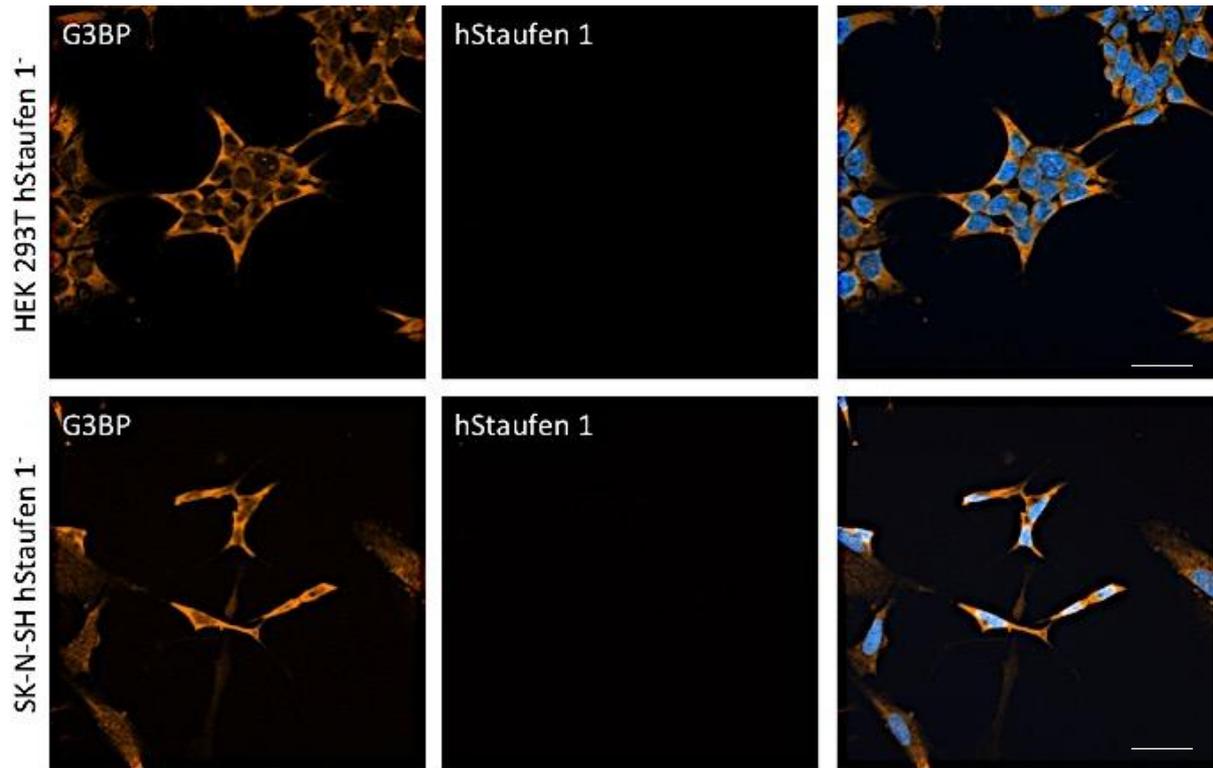


Figure 53 : La diminution d'expression de hStaufen 1 n'induit pas la formation de granules de stress

Les cellules SK-N-SH sont transduites avec le vecteur stau48 à MOT 5 durant 72h. Pour les cellules HEK293T, il s'agit du clone hStaufen 1⁻. Les cellules sont fixées puis soumises à un immunomarquage avec un anti-G3BP et un anti-hStaufen 1 pour révéler les protéines endogènes correspondantes. Les noyaux sont colorés avec le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 11µm.

Les mêmes expériences ont été conduites dans des cellules infectées (Cf.fig54). 24 heures après l'infection, la protéine G3BP est réarrangée sous forme de granules à proximité des Corps de Negri, comme décrit dans la littérature. Ceci rappelle le comportement de la protéine hStaufen 1 elle-même. On observe une colocalisation partielle de la protéine G3BP, marqueur des granules de stress, et de la protéine hStaufen 1, laissant à penser que la relation entre hStaufen 1 et ces structures, tout comme avec la polymérase rabique, est dynamique. Cela impliquerait des mouvements de va et vient de la protéine hStaufen 1 dans le cytoplasme, pour interagir avec des ARNs spécifiques, et les conduire vers les granules de stress où il y seraient accumulés et leur traduction réprimée.

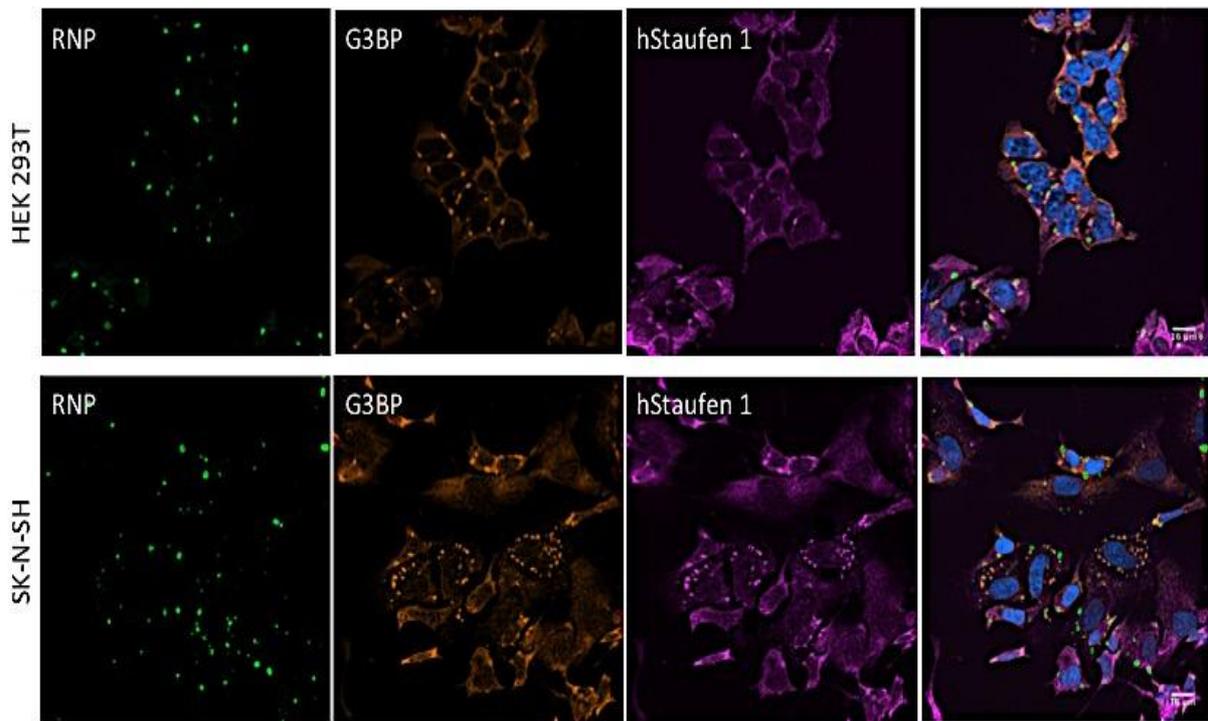


Figure 54 : L'infection rabique induit la formation de granules de stress dans lesquels la protéine hStaufen 1 est recrutée

Les cellules HEK293T et SK-N-SH sont infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 2. Les cellules sont fixées 24 heures post infection puis immunomarquées avec un anticorps anti-N, un anti-G3BP et un anti-hStaufen 1 afin de visualiser les Corps de Negri et les protéines G3BP et hStaufen 1 endogènes. Les noyaux sont colorés par le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 15µm.

Nous avons observé l'effet de la diminution d'expression de hStaufen 1 sur cette induction virale de granules de stress (Cf.fig55). Si l'infection des cellules HEK293T et l'induction de granules de stress ne sont pas perturbées par la diminution d'expression de la protéine hStaufen 1, la formation des granules de stress est totalement inhibée dans les cellules SK-N-SH. Ceci suggère des mécanismes différents, dépendants du type cellulaire et de la protéine hStaufen 1 pour la formation des granules de stress. L'analyse quantitative de ces granules n'a pu être faite durant cette thèse, mais il aurait été intéressant de vérifier si la protéine hStaufen 1, sans être un élément indispensable à la formation de ces granules dans le cas des cellules HEK293T, ne régule pas, négativement ou positivement, leur formation.

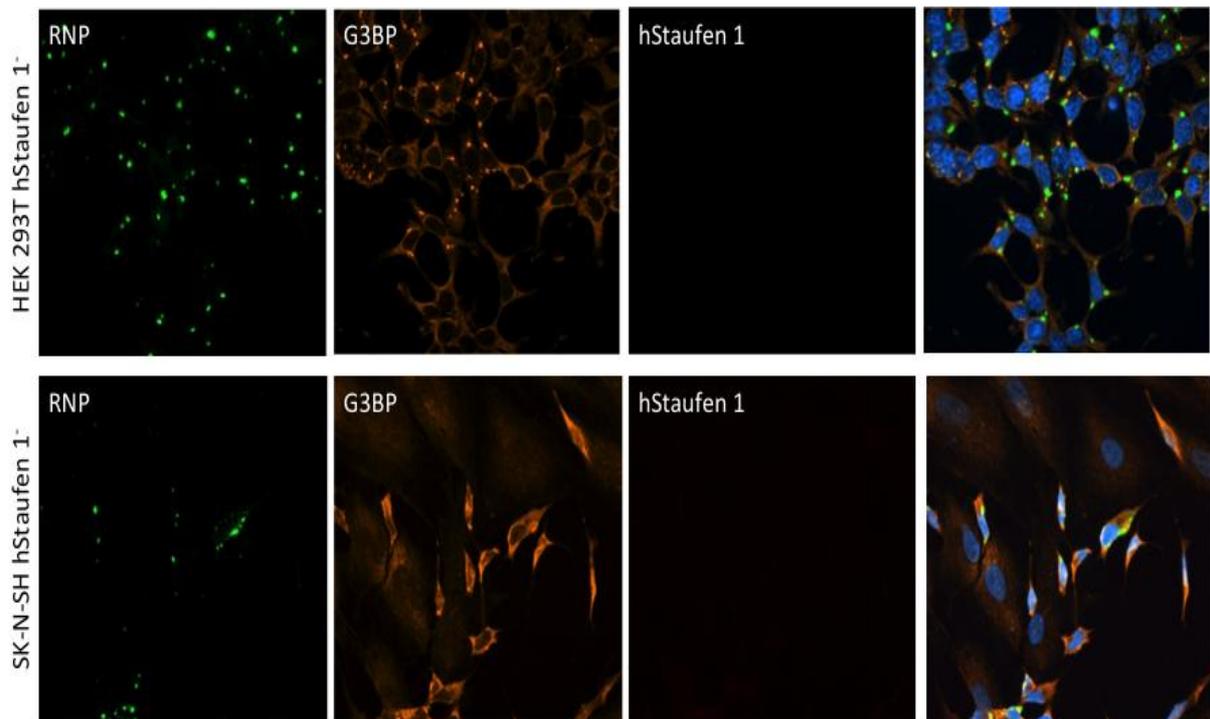


Figure 55 : La diminution d'expression de hStaufen 1 influence la formation des granules de stress viraux induits de façon différente selon le type cellulaire

Les cellules SK-N-SH sont transduites avec le vecteur stau48 à MOT 5. 72h post transduction, les cellules sont infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 2. Le clone cellulaire HEK293T hStaufen 1⁻ est infecté de la même manière. 24h post infection les cellules sont fixées puis soumises à immunomarquage avec un anticorps anti-N pour visualiser les Corps de Negri, un anti-G3BP et un anti-hStaufen 1 pour visualiser les protéines G3BP et hStaufen 1 endogène correspondantes. Les noyaux sont marqués avec le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 15µm.

Nous avons également réalisé des expériences d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) avec des sondes spécifiques des ARNm de la rage afin de voir si la protéine hStaufen 1 joue un rôle dans l'échange d'ARN du corps de Negri vers les granules de stress. Ces expériences sont en cours de réalisation lors de l'écriture de ce rapport et ne seront pas rapportées dans ce mémoire.

C. La protéine hStaufen 1 et le transport intracellulaire des RNPs néosynthétisés

1. La protéine hStaufen 1 est elle une protéine associée aux microtubules (MAPs) ?

Il est décrit que la protéine hStaufen 1 intervient dans le transport intracellulaire de nombreux ARNm et complexes ribonucléoprotéiques, via le réseau microtubulaire, notamment le long des neurones. L'absence de dissémination intracellulaire du virus rabique suite à la diminution d'expression de hStaufen 1 nous a poussé à étudier ce transport. Nous avons utilisé des cellules SK-N-SH traitées à l'acide transrétinoïque (ATRA) pour les amener à un stade de différenciation neuronale plus poussé. Ainsi, leur corps cellulaire est ramassé, le noyau occupant la majorité de l'espace, et elles présentent une neurite principale, prolongement similaire à un axone mais non polarisé (Cf.fig58). Ces cellules sont appelées SK-N-SH D (pour « différenciées »).

Afin de déterminer si la protéine hStaufen 1 est une MAP (protéine associée aux microtubules), une quantité importante de cellules SK-N-SH D (5g) est utilisée pour purifier deux fractions protéiques : (1) la « fraction MAPs » contenant l'ensemble des protéines associées aux microtubules dont les moteurs cellulaires, tels que la kinésine et la dynéine, et (2) la « fraction tubuline » qui contient la tubuline purifiée.

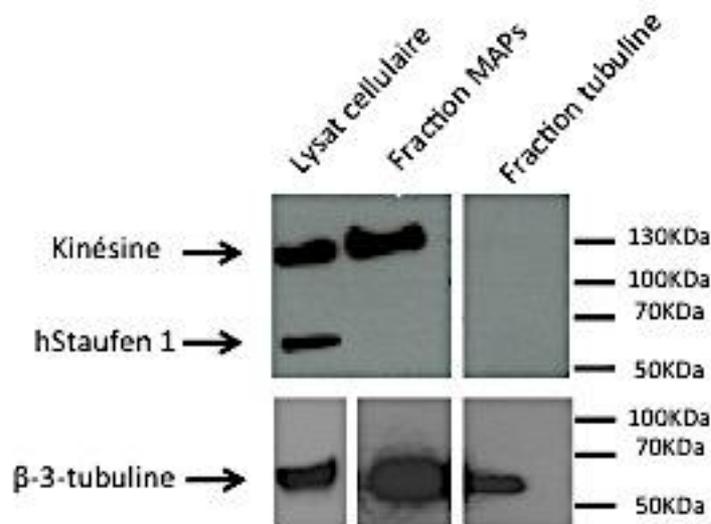


Figure 56 : la protéine hStaufen 1 n'est pas une protéine associée aux microtubules

5 g de cellules SK-N-SH D (≈ 820 millions de cellule) sont lysées puis traitées selon le protocole de purification des microtubules (Cf.MetM.II.K). Les fractions correspondant au lysat cellulaire initial (lysat cellulaire), aux MAPs purifiées (fraction MAPs) et à la tubuline purifiée (fraction tubuline) sont analysés par Western Blot avec un anticorps anti-kinésine, un anti-hStaufen1 et un anti- β -3-tubuline.

La figure n°56 montre que le lysat cellulaire de départ des cellules SK-N-SH D comprend bien la tubuline (détectée par la β -3-tubuline une des deux sous-unités α et β de la tubuline), les MAPs (détectées par la kinésine) ainsi que la protéine hStaufen 1. De même, la méthode de purification des microtubules est validée puisque la β -3-tubuline est détectée dans la fraction « tubuline » et la kinésine dans la fraction « MAP » associée au réseau microtubulaire. Simplement, β -3-tubuline est aussi présent dans la fraction MAP, ce qui suggère qu'elle est co-purifiée en partie avec la fraction MAP. Cette séparation a été utilisée par une autre équipe de l'Institut Pasteur (C. Préhaud) qui a détecté la protéine MAST2, pressentie comme associée aux microtubules, dans la fraction MAPs exclusivement. Cependant, si la séparation des fractions « tubuline » et « MAP » semble acceptable, la protéine hStaufen 1 n'est pas détectée ni dans l'une, ni dans l'autre ce qui indique qu'elle n'est pas associée, du moins directement, au réseau microtubulaire et qu'elle ne peut être considérée comme une MAP.

Pour vérifier que ce résultat négatif n'est pas dû à un chargement du gel inférieur au seuil de détection de la protéine hStaufen 1, une gamme de lysat SK-N-SH D a été préparée à partir de 8,2 millions de cellules lysées dans 500 μ l de tampon de lyse (NP-40) et une quantité croissante de ce lysat est déposé sur un gel (figure n°57)

A

Lysat 8,2 millions SK-N-SH D									
Volume de lysat déposé (μl)	1	2	4	8	12	16	24	30	37,5
Nombre de cellule	16400	32800	65600	131200	196800	262400	393600	492000	615000

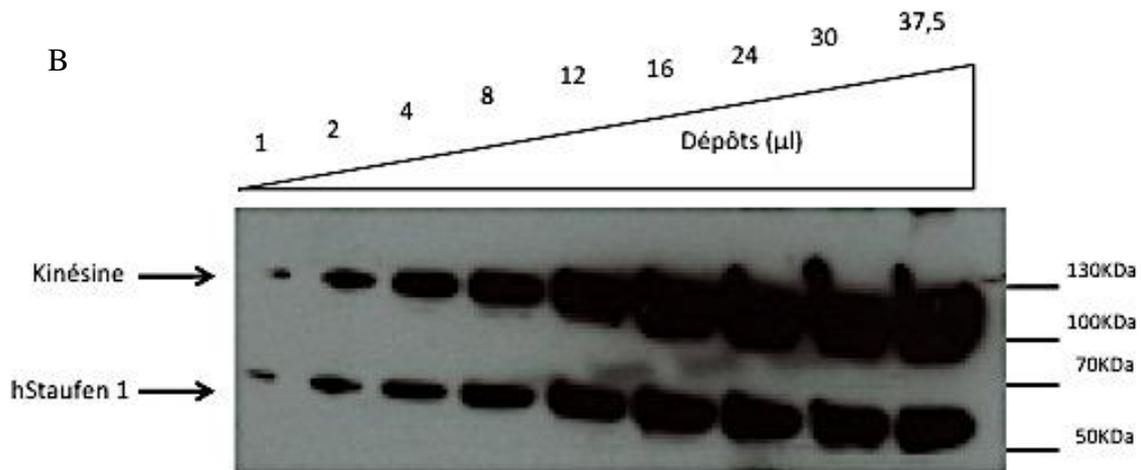


Figure 57 : Gamme de détection par Western Blot des protéines kinésine et hStaufen 1

Les cellules SK-N-SH D sont lysées puis analysées par western blot avec un anticorps anti-kinésine et un anti-hStaufen 1.

(A) Tableau des correspondances entre volume de lysat et nombre de cellules

(B) Le lysat cellulaire est déposé en doses croissantes afin de déterminer le nombre de cellules minimum permettant de détecter les protéines kinésine et hStaufen 1

Il apparaît que la détection de la protéine hStaufen 1, tout comme celle de la kinésine, se fait dès 1μl de lysat déposé, soit 16 400 cellules (Cf.fig57). Comme le culot cellulaire des 8,2 millions de cellule pèse 50mg, les 5g de cellules utilisés pour la purification des fractions MAPs et tubuline correspondent à environ 820 millions de cellules. En estimant que 50% de perte ait eu lieu au cours des différentes étapes réalisées, ceci réduit le nombre de cellule à 410 millions. Pour le Western Blot de la fraction MAPs, 1/30^{ème} de l'échantillon (20μl sur les 600μl totaux de la fraction) ont été déposés. Si les 600μl correspondent aux MAPs purifiés de 410 millions de SK-N-SH D, ceci équivaut au dépôt de 13,7 millions de cellules, une quantité très largement supérieure au seuil de détection de la protéine hStaufen 1 correspondant à 16 400 cellules. Ce résultat confirme que hStaufen 1 n'est probablement pas une protéine associée aux microtubules. Peut-être le virus de la rage détourne-t-il la protéine hStaufen 1, via la polymérase, pour l'utiliser comme lien avec un complexe protéique associé aux

microtubules ou avec un moteur cellulaire ? L'identification de cet intermédiaire n'a pas pu être réalisée durant cette thèse.

Nous avons également observé la relation entre hStaufen 1 et le réseau microtubulaire par immunofluorescence. Pour cela, les SK-N-SH D sont fixées et immunomarquées avec des anticorps anti-hStaufen 1 et β -3-tubuline, qui nous sert de marqueur du réseau microtubulaire.

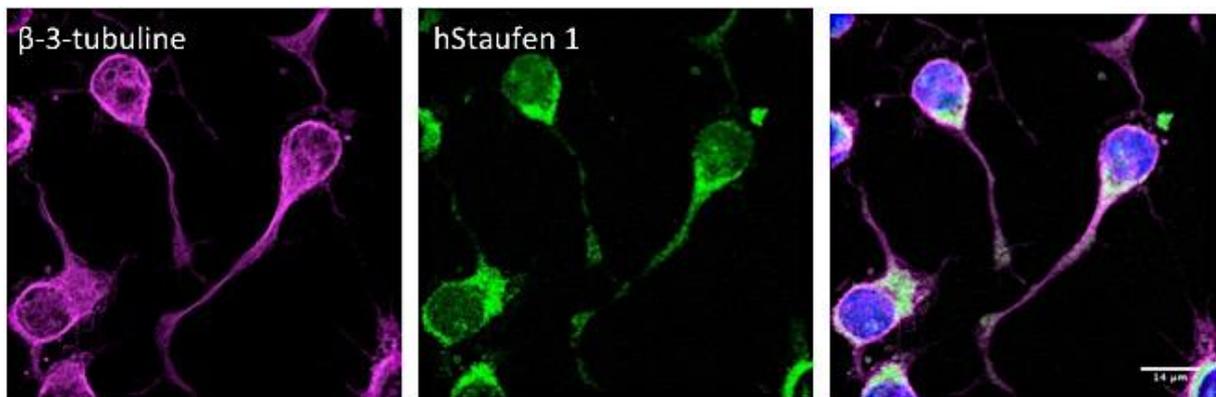


Figure 58 : La protéine hStaufen 1 est présente dans les neurites des cellules SK-N-SH D
Les cellules SK-N-SH D sont fixées et immunomarquées avec un anticorps anti- β -3-tubuline et anti-hStaufen 1 afin de visualiser les protéines β -3-tubuline et hStaufen 1 endogènes. Les noyaux sont marqués par le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 14 μ m.

La Figure n°58 montre la β -3-tubuline sous forme filamenteuse entourant le noyau puis se propageant dans le prolongement de la cellule jusqu'à l'extrémité neurale. La protéine hStaufen 1 présente un aspect en « paillettes » dans l'ensemble du cytoplasme. Cependant, sa répartition n'est pas homogène, une accumulation plus importante étant observée à la base neurale de la cellule, probablement pour assurer le transport d'éléments cellulaires le long de la neurite. Il n'y a pas de colocalisation entre les deux protéines mais plutôt un rapprochement. L'aspect ponctiforme de la protéine hStaufen 1 est une caractéristique des complexes de transport microtubule dépendant (Kiebler and Bassell 2006).

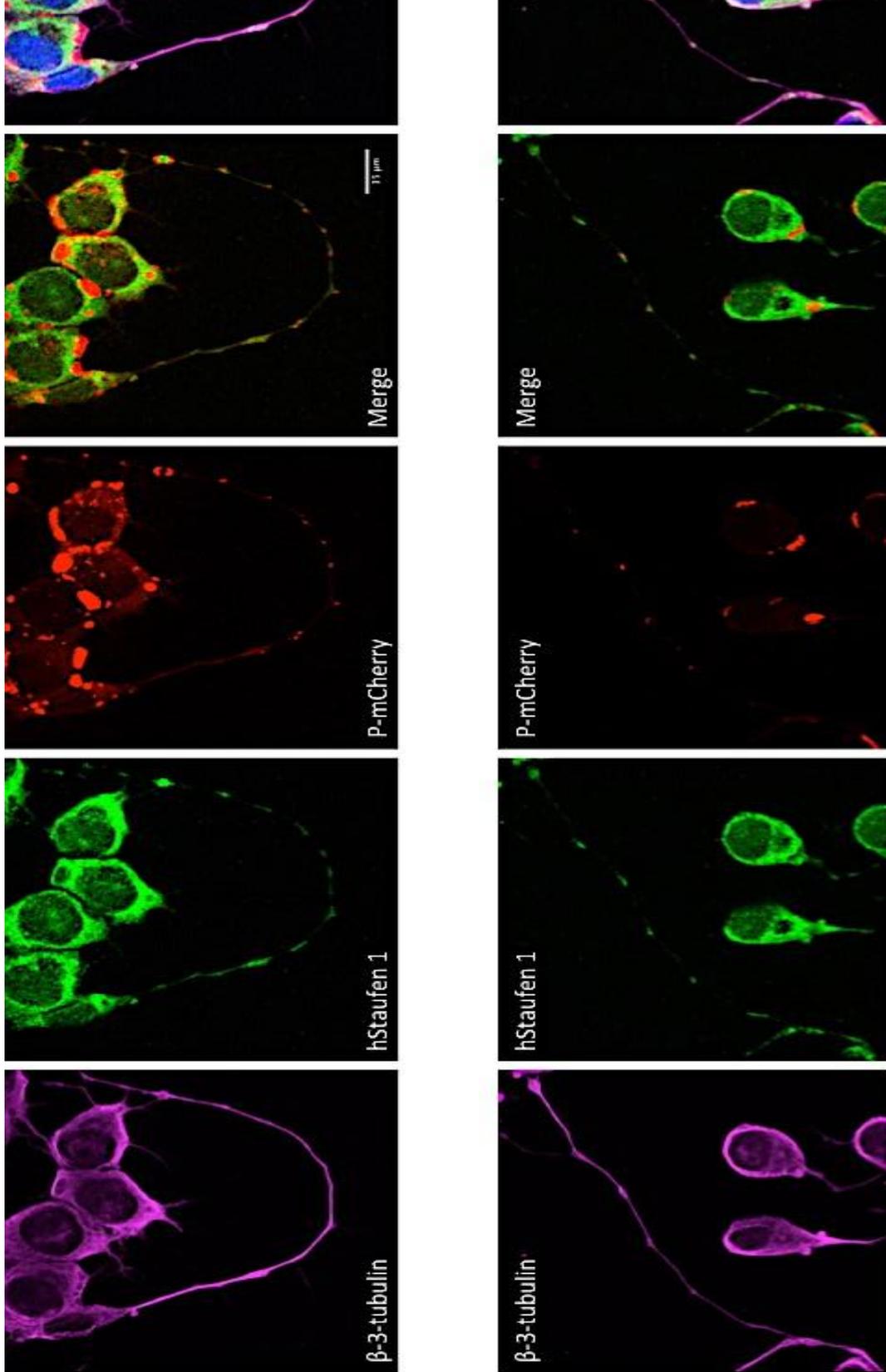
2. La protéine hStaufen 1 est condensée autour des RNPs néosynthétisées dans les prolongements neurales.

Nous avons préalablement montré que la diminution d'expression de hStaufen 1 entraîne un blocage dans la formation des corps de Negri secondaire ainsi que dans le bourgeonnement des particules virales dans le surnageant des cellules. Il est décrit que la protéine hStaufen 1 intervient dans le transport de complexes protéiques via le réseau microtubulaire sous forme de granules (Kiebler and Bassell 2006) .Il est également décrit que la formation des corps de Negri secondaires ainsi que le routage intracellulaire des RNPs néoformées est dépendant des microtubules (Nikolic, Le Bars et al. 2017). Pourtant la protéine hStaufen 1, bien que semblant intervenir dans le transport des RNPs rabiques, n'en est pas le moteur car non associée directement aux microtubules. Nous avons visualisé plus précisément le transport des RNPs le long d'un prolongement neural afin d'évaluer le rôle que hStaufen 1 pourrait jouer à ce niveau.

Les cellules SK-N-SH D sont infectées avec la souche SAD du virus rabique exprimant une protéine marquée mCherry-P afin de pouvoir suivre les RNPs en microscopie. La protéine P est décrite comme fortement présente dans les corps de Negri mais également comme un élément constituant des RNPs, en plus grande quantité que la L et donc plus facile à observer. Quarante huit heures après l'infection, les cellules sont fixées et immunomarquées pour la détection des protéines hStaufen 1 et β -3-tubuline.

La figure n°59 montre que la protéine hStaufen 1 se répartit en collier de perles le long de la neurite. Il en va de même pour les RNPs qui ont une répartition un peu plus parcellaire le long du prolongement neural. Cette similarité de détection suggère le possible détournement par les RNPs pour leur transport neural. La composition protéique de ces spots protéiques le long des neurites n'a pas pu être identifiée faute de temps, tout comme le ou les moteurs cellulaires potentiellement impliqués. De la même façon, le prolongement des cellules SK-N-SH D n'est pas orienté, il n'est donc pas possible de dire si ce recrutement est utilisé pour le transport rétrograde et/ou antérograde des RNPs le long de la neurite.

A



B

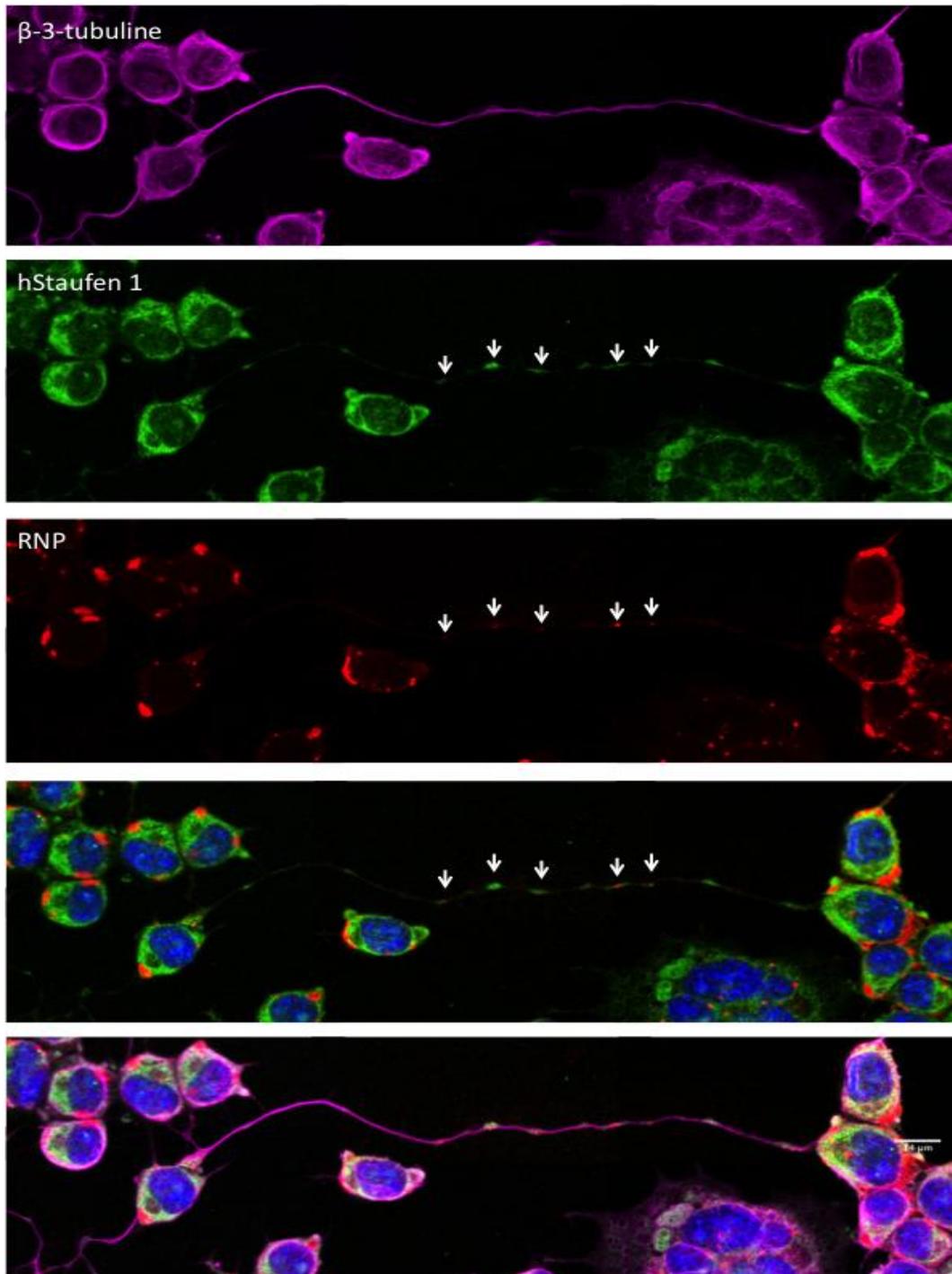


Figure 59 : La protéine hStaufen se condense autour des RNPs transitant le long des neurites

(A) Les cellules SK-N-SH D sont infectées avec la souche SAD-mCherryP du virus rabique à une MOI 2 et fixées 48h post infection. Elles sont ensuite immunomarquées avec un anticorps anti-β-3-tubuline et un anti-hStaufen 1 pour visualiser les protéines β-3-tubuline (mauve) et hStaufen 1 (vert) endogènes. La protéine mCherryP est visualisée en rouge. Les noyaux sont colorés par le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 15μm.

(B) Les cellules SK-N-SH D sont infectées, fixées et immunomarquées comme pour le A). L'image est issue d'une mosaïque de huit acquisitions assemblées pour suivre la totalité d'une neurite. La barre d'échelle correspond à 14μm

Discussion et Perspectives

Les virus utilisent une multitude de stratégies pour détourner à leur profit la machinerie cellulaire. L'un des mécanismes les plus utilisés est l'interaction avec des protéines cellulaires de fonctions biologiques clés dans les voies qu'ils doivent utiliser ou éviter. L'étude de ces partenaires cellulaires nous montre toute la complexité et la subtilité que le monde viral a mis en place lors de la coévolution avec ses hôtes. Mieux comprendre le fonctionnement de ces mécanismes à l'interface entre le virus et la cellule permet d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles ayant une capacité de mutation moins importante mais potentiellement délétère à la cellule elle-même. Ceci constitue un avantage crucial car les mutations sont la principale cause des échecs dans le développement de traitement antiviraux.

Étude structurale de l'interaction entre la polymérase rabique et la protéine hStaufen 1

Nous avons déterminé que la protéine hStaufen 1 est un partenaire exclusif de la polymérase rabique L et que l'interaction requiert l'extrémité Cterminale des deux protéines. Pour la L rabique cette extrémité est flexible et se réorganise lors du fonctionnement du complexe de transcription (Liang, Li et al. 2015), mais elle est aussi autonome et a été décrite comme étant la zone d'interaction avec la protéine P (Chenik, Schnell et al. 1998, Jacob, Real et al. 2001). C'est d'ailleurs cette interaction qui entraîne une réorganisation du complexe et augmente la processivité de la L. Concernant la protéine hStaufen 1, le domaine dsRBD5 est le domaine avec le profil d'interaction le plus polyvalent et définit la voie cellulaire dans laquelle la protéine agit en fonction du partenaire lié. Il n'existe pas à l'heure actuelle de données cristallographiques sur la conformation de la L ou de ses domaines, seule ou en complexe avec les RNPs, de même qu'avec la protéine hStaufen 1. Mais il ne fait aucun doute que l'identification de l'organisation de ces protéines, virales et cellulaires, pourra permettre de mieux comprendre leurs interactions. De plus, la zone d'interaction sur la L étant la même pour la P et la protéine hStaufen 1, il est possible qu'une compétition existe entre les deux. Une meilleure connaissance des phases du cycle durant lesquelles la L et la protéine hStaufen 1 interagissent permettrait d'éclairer le rôle exact que joue cette dernière.

De la même façon, il serait intéressant d'étudier la protéine hStaufen 2 comme partenaire de la L rabique. Des expériences préliminaires réalisées au sein de l'Unité montrent que cette interaction existe aussi. Or, la protéine hStaufen 2 a comme caractéristique majeure de n'être exprimée qu'au niveau neuronal, compartiment privilégié du virus de la rage. Seule les deux premiers isoformes de la protéine hStaufen 2 possèdent le domaine dsRDB5 (Cf.fig22) présent sur la protéine hStaufen 1 et décrite comme responsable de l'interaction avec la L rabique. L'étude de l'interactivité des isoformes de la protéine hStaufen 2 pourrait nous permettre de mieux comprendre sa relation avec le virus, et peut-être d'identifier des activités biologiques propres à chaque isoforme.

Corps de Negri et protéine hStaufen 1 : un duel pour la polymérase rabique

La polymérase est une enzyme multifonctionnelle clé du cycle viral notamment pour la transcription du génome, la pose de la coiffe et la polyadénylation des ARNm ainsi que la réplication. Pour autant, elle est la protéine virale la moins représentée non seulement au niveau du virion (Thomas, Newcomb et al. 1985) mais aussi dans le cytoplasme, ce qui la rend extrêmement difficile à observer au microscope. Les anticorps spécifiques sont très rares et précieux. Une production d'anticorps polyclonaux avait été réalisée antérieurement dans l'Unité mais était quasiment épuisée au moment du début de mes travaux. Afin de pouvoir étudier *in vitro* la relation entre la protéine hStaufen 1 et la L rabique, il a donc été nécessaire de fusionner une GFP fluorescente à l'extrémité Nterminale (GFP-L) afin que cette étiquette ne viennent pas perturber le domaine d'interaction avec hStaufen 1 à l'extrémité Cterminale. Cette construction exprimée en quantité suffisante par un plasmide, a permis d'étudier la relation L-hStaufen 1 soit dans un contexte d'infection, en présence des autres protéines rabiques, soit en se libérant de l'influence de ces protéines.

L'expression de la GFP-L, en absence de toute autre protéine virale, conduit à la réorganisation de la protéine hStaufen 1, normalement en granulation diffuse dans le cytoplasme. Il se forme alors des structures cytoplasmiques ponctiformes au sein desquelles la L et hStaufen 1 colocalisent. Nous ne sommes pas parvenus à apporter une réponse satisfaisante quant à la nature de ces structures dans lesquelles les protéines hStaufen 1 et la L rabique sont recrutées (G3BP : granules de stress ; XRN1 : P-Bodies). Toutefois, nous pensons que la protéine hStaufen 1 est l'élément déterminant pour cette localisation

subcellulaire. L'identification de ce compartiment permettrait de mieux comprendre pourquoi cette colocalisation n'est pas retrouvée dans un contexte d'infection.

En effet, suite à l'infection des cellules par le virus de la rage la protéine hStaufen 1 est aussi réorganisée et se retrouve cette fois-ci sous forme punctiforme à proximité des corps de Negri sans qu'il y ait colocalisation entre les deux structures. Elle ne colocalise plus avec la L (visible grâce à la transfection du plasmide GFP-L) car la L est recrutée dans les CNs. Ceci indique d'une part que la L présente plus d'affinité pour les partenaires (viraux et/ou cellulaires) présents dans les CNs que pour hStaufen 1 qui n'y pénètre pas. D'autre part, le tag GFP en position N-terminale n'influence pas la relation de la L avec ces autres partenaires viraux et/ou cellulaires des CNs. Nous ne sommes pas parvenus à identifier la ou les protéines qui influencent ce changement. La protéine P est un bon candidat, puisqu'elle partage la même région d'interaction sur la L que la protéine hStaufen 1. De plus, avec la protéine N, elles sont les deux éléments minimaux permettant de reconstituer un CN (Nikolic, Le Bars et al. 2017). Une meilleure compréhension de la relation entre la L et la P, et le développement de méthodes d'observation de la structure des complexes L-P, L-hStaufen 1 et L-P-hStaufen 1 permettraient de mieux comprendre le niveau d'influence de la protéine P sur l'interaction de la L avec la protéine hStaufen 1.

Une étude récente sur le virus rabique a montré sa capacité à induire des granules de stress, marquée par une condensation cytoplasmique de la protéine G3BP (Nikolic, Civas et al. 2016). De plus, la protéine hStaufen 1 est décrite comme un élément caractéristique de ces structures, où elle y est présente (Thomas, Martinez Tosar et al. 2009, Nikolic, Civas et al. 2016). Nous ne sommes pas parvenu à reproduire les données de la littérature sur l'induction de granules de stress suite à la diminution d'expression de la protéine hStaufen 1. Toutefois, après infection par le virus de la rage, la protéine G3BP forme des granules à proximité des corps de Negri, et colocalise même partiellement avec la protéine hStaufen 1. Ceci suggère que hStaufen1 pourrait effectuer des va et vient dynamiques entre les CNs et les granules de stress pour y conduire des ARNm qui y seraient accumulés et leur traduction réprimée. Un tel échange des ARNm viraux des CNs vers les granules de stress a déjà été démontré (Nikolic, Civas et al. 2016). Les premières expériences de FISH, pour marquer les ARNm viraux et identifier le rôle de la protéine hStaufen 1 dans cet échange, n'ont pas été concluantes et demandent à être renouvelées. Elles pourraient permettre d'attribuer un nouveau rôle à la protéine hStaufen 1 dans le cycle viral rabique d'autant que cette protéine est décrite comme pouvant lier les ARNm.

Notons que dans le contexte de l'infection, si la diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 ne semble pas perturber la formation des granules de stress dans les cellules HEK293T, leur formation est totalement inhibée dans les cellules neuronales SK-N-SH ce qui suggère des mécanismes différents, selon le type cellulaire. L'identification des voies de formation de ces structures suivant le modèle cellulaire et l'importance de la protéine hStaufen 1 seraient des informations essentielles pour mieux comprendre l'influence de la protéine hStaufen 1 sur l'infection rabique. A l'heure actuelle, nous n'avons pas obtenu de réponse satisfaisante quant au rôle de la protéine hStaufen 1 dans l'induction des granules de stress et dans son recrutement dans ces granules pour le cycle répliatif du virus.

Des études de vidéo-microscopie nous ont permis d'observer une relation dynamique entre la protéine hStaufen 1 et les CNs ce qui confirme encore son rôle d'intermédiaire. Les granules de hStaufen 1 gravitent autour des CNs sans qu'il y ait colocalisation ou contacts entre les deux structures. Les mouvements de la protéine hStaufen 1 semblent coordonnés, contrairement aux CNs qui sont plus statiques. L'établissement d'un système de vidéo-microscopie permettant de visualiser le réseau microtubulaire, ainsi que la protéine hStaufen 1 et les CNs, permettrait de mieux comprendre la nature de ces mouvements et le lien entre ces deux structures.

Vecteur lentiviral et shRNA : diminution d'expression protéique réussit

La raison initiale de mon arrivée dans l'unité des Stratégies Antivirales a été mon expérience en matière de construction/transduction de vecteurs lentiviraux que j'avais manipulés durant mon stage de Master 1 dans l'Unité du Dr Pierre Charneau. Cette demande était consécutive à l'inefficacité de siRNA transfectés à diminuer l'expression des partenaires cellulaires de la polymérase rabique mis en évidence par le crible en double hybride. Le principal obstacle a été d'obtenir des niveaux de diminution d'expression protéique suffisants pour observer un effet mais non délétère pour nos modèles cellulaires. La transduction des cellules par les vecteurs lentiviraux n'entraîne aucune cytotoxicité liée au vecteur lui-même, un point que nous avons pu vérifier avec la plupart de nos vecteurs « contrôles » ne codant pas de shRNA. Les vecteurs portant les shRNAs spécifiques ont permis d'atteindre un niveau de diminution d'expression protéique optimal dès 1 MOT (*Multiplicity Of Transduction*) et de façon spécifique. Ces vecteurs offrent également la possibilité de produire des clones

cellulaires transduits de façon stable avec un profil d'extinction homogène et en adéquation avec l'étude. Cela permet de travailler avec une population cellulaire homogène et d'avoir une reproductibilité dans les résultats. Si nous avons réussi assez aisément à obtenir des clones stables de cellules HEH293T, ceci a été impossible avec les cellules SH-N-SH qui sont sensibles et supportent très mal d'être clonées. Dans leur cas, nous avons travaillé avec des populations cellulaires avec des profils de transduction hétérogène.

La protéine hStaufen 1 et son rôle dans le transport intracellulaire viral

La diminution intracellulaire de la protéine hStaufen 1 nous a permis de montrer qu'elle n'était pas impliquée dans la susceptibilité des cellules au virus de la rage. Le taux d'infection et la mise en place du/des CNs primaires étant identiques, qu'il y ait ou non altération de l'expression de la protéine hStaufen1. Notre hypothèse est que l'indépendance du réseau microtubulaire durant les étapes précoces de l'infection permet de se soustraire à l'influence de la protéine hStaufen 1. Toutefois, les modèles cellulaires utilisés ne font pas intervenir de transport durant ces phases précoces alors que c'est le cas dans les neurones lors de l'infection naturelle. En effet, l'endosome contenant les virus est transporté de façon rétrograde le long du réseau microtubulaire, depuis la synapse jusqu'au corps cellulaire (Gluska, Zahavi et al. 2014). Il serait pertinent d'utiliser un système cellulaire polarisé afin de suivre la progression du virus dans des directions contrôlées (antérograde et rétrograde) et d'ainsi observer l'effet de la diminution d'expression de hStaufen 1 sur l'étape d'infection.

Au delà de la phase précoce, nous avons mis en évidence qu'une diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 entraîne une accumulation des protéines virales intracellulaires, avec un effet beaucoup plus important sur son partenaire, la protéine L. Pourtant, hStaufen 1 n'est pas impliquée dans les activités de transcription et de réplication virales, ce qui paraît logique considérant que l'immunofluorescence ne permet pas de détecter hStaufen 1 dans les CNs, dans lequel ces activités enzymatiques virales ont lieu. On ne peut exclure qu'une très faible quantité de protéine hStaufen 1, proportionnelle à celle de la L, ou une absence d'accès des anticorps rendent difficile l'observation d'une colocalisation de hStaufen 1 dans les CNs. Un protocole permettant la purification des CNs pourrait permettre l'identification de l'ensemble des partenaires viraux et cellulaires présents dans ces structures.

La cinétique d'infection a permis de suivre l'infection ainsi que la formation et la maturation des CNs au cours du temps. La protéine hStaufen 1 n'est pas impliquée dans la phase précoce d'infection du virus de la rage car la mise en place des CNs primaires et leur développement ne sont pas modifiés lors de la diminution d'expression de la protéine hStaufen 1. La différence s'opère lors de la formation des CNs secondaires. Dans les cellules transduites avec le vecteur contrôle des structures punctiformes de taille inférieure, les CNs secondaires, apparaissent progressivement après 24h d'infection dans le cytoplasme et se déplacent progressivement vers la membrane cellulaire. Ce déplacement est microtubule dépendant et fait intervenir un transport dont le mécanisme n'est pas encore élucidé (Nikolic, Le Bars et al. 2017). En revanche, dans les cellules où hStaufen1 est diminuée, les CNs primaires grossissent et semblent s'engorger ce qui correspond à l'accumulation intracellulaires des protéines virales décrite précédemment. Notre hypothèse est que la protéine hStaufen 1, par sa capacité de liaison à la tubuline et/ou aux moteurs cellulaires, et à la L permet aux RNPs issues des CNs de s'associer au réseau microtubulaire pour leur transport intracellulaire jusqu'à la membrane cellulaire où elle retrouvent la glycoprotéine G pour s'envelopper et bourgeonner. La encore, l'étude structurale du complexe RNP/hStaufen 1 pourrait permettre de mieux comprendre les différences qui s'opèrent lors de la formation des CNs secondaires et le routage des RNPs depuis les CNs vers le site de bourgeonnement.

L'engorgement des CNs dans les cellules où hStaufen 1 est diminuée s'explique, en plus d'un potentiel blocage du transport, par la nature liquide de CNs, décrite dans une étude récente montrant qu'ils peuvent se désassembler et fusionner entre eux (Nikolic, Le Bars et al. 2017). Ainsi, les éléments expulsés du/des CNs primaires ne pouvant se déplacer, fusionneraient pour former les grosses usines virales observées. La protéine hStaufen 1 interviendrait donc aussi bien dans la formation des CNs secondaires que dans la dissémination intracellulaire des nucléocapsides. Cette hypothèse a été confirmée par l'infection des cellules différenciées SH-N-SH D par le virus de la rage. Dans leurs prolongements cellulaires (neurites) les RNPs néosynthétisés et la protéine hStaufen 1 sont clairement à proximité. Ceci renforce l'idée d'un rôle de la protéine hStaufen 1 dans le transport des protéines virales. De plus, l'ensemble des mécanismes viraux impactés par la diminution d'expression de hStaufen 1 sont microtubules dépendants (formation CNs secondaires, dissémination intracellulaire et bourgeonnement viral).

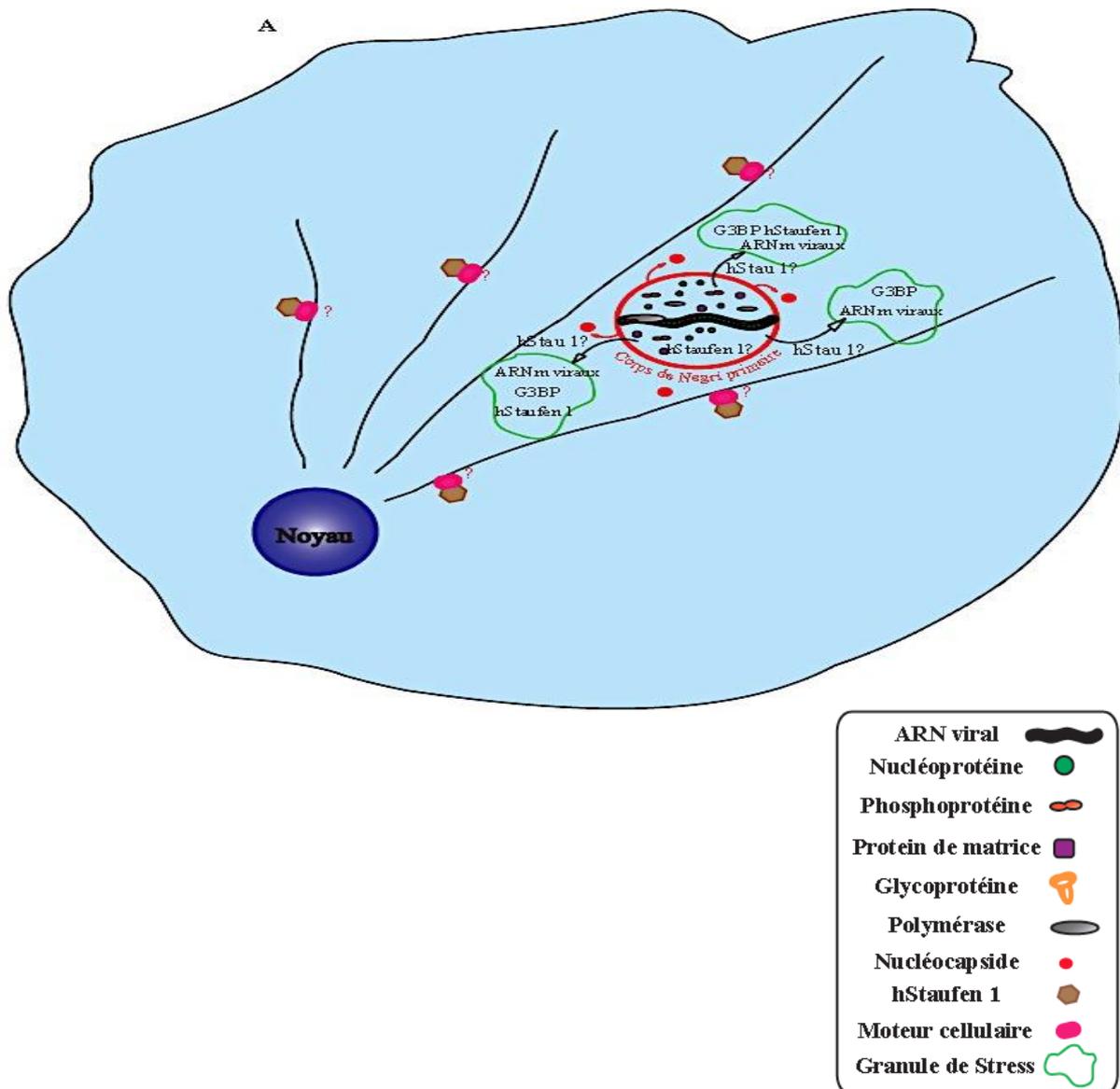
Pourtant, la purification de la tubuline et des protéines associées (MAPs) n'a pas permis d'identifier la protéine hStaufen 1 comme étant lié directement aux réseaux microtubulaires. Peut-être reste-t-il un/des partenaire(s) intermédiaires à identifier liant la protéine hStaufen 1 au réseau microtubulaire, ayant une fonction motrice dans le transport. Il faut rappeler ici que la protéine hStaufen 1 est décrite comme s'associant aux protéines Dynéine et Kinésine, respectivement moteurs cellulaires des transports rétrograde et antérograde. Le détournement de hStaufen 1 serait pour le virus un adaptateur lui permettant de se transporter dans la cellule. De même, si nous n'avons pas pu montrer d'interaction entre la protéine hStaufen 1 et les protéines MAP2 ou Myosine, des résultats préliminaires de qPCR indiquent que la diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 conduit à la modulation négative des gènes MAP2 et Myosine.

Le rôle de la protéine hStaufen1 dans le bourgeonnement du virus de la rage

La diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 entraîne une diminution d'infectivité des virion libérés dans le surnageant cellulaire, quantifiés par titrage sur un tapis cellulaire vierge. Deux hypothèses sont possibles : soit moins de virions sont libérés, soit ils sont moins infectieux. La quantification de l'ARN génomique dans le surnageant par QPCR nous indique une diminution, parallèle à celle de l'infectivité, de leur libération dans le surnageant des cellules diminuées en leur expression de hStaufen 1. Toutefois, cette diminution est à un degré moindre qui peut s'expliquer par la libération d'ARN (lyse cellulaire, ...) et la plus grande sensibilité de la technique. Ainsi, l'hypothèse la plus probable est que la protéine hStaufen 1 permet le routage des nucléocapsides des CNs vers les sites de bourgeonnements.

D'ailleurs, la purification des particules virales rabiques issues de surnageants de cellules infectées permet la co-détection de protéines virales (RNP) et de la protéine hStaufen 1. Même si cette détection est en faible quantité, ce qui demande de concentrer fortement les productions virales, il faut la comparer à son partenaire, la protéine L, qui représente seulement 50 molécules par particule virale. Si la protéine hStaufen 1 est encapsidée via son interaction avec la L, il est attendu qu'elle ne soit qu'en faible quantité dans la particule virale. Nous n'avons cependant pas pu co-détecter la protéine L et la protéine hStaufen 1, ce qui nous aurait permis d'observer s'il existe une relation dose-dépendante. L'option de

visualiser la présence de hStaufen 1 dans la particule virale par microscopie électronique n'a pas été poursuivie en raison : (i) de la difficulté à perméabiliser la particule virale sans perdre la conformation du virus ; (ii) de la difficulté à observer des événements rares par cette technique. Il ne nous a de même pas été possible de valider comparativement l'absence de la protéine hStaufen 1 dans les particules virales produites sur cellules diminuées en hStaufen 1. Notre stratégie d'étude étant une diminution d'expression et non une abolition, comme avec un système CRISPR-Cas9, cette production virale est issue de la présence résiduelle de la protéine hStaufen 1. L'utilisation d'un modèle dépourvu totalement de cette protéine, à condition que ceci soit viable pour la cellule, nous permettrait peut-être d'évaluer le degré d'importance de la protéine hStaufen 1 dans la production de particules virales.



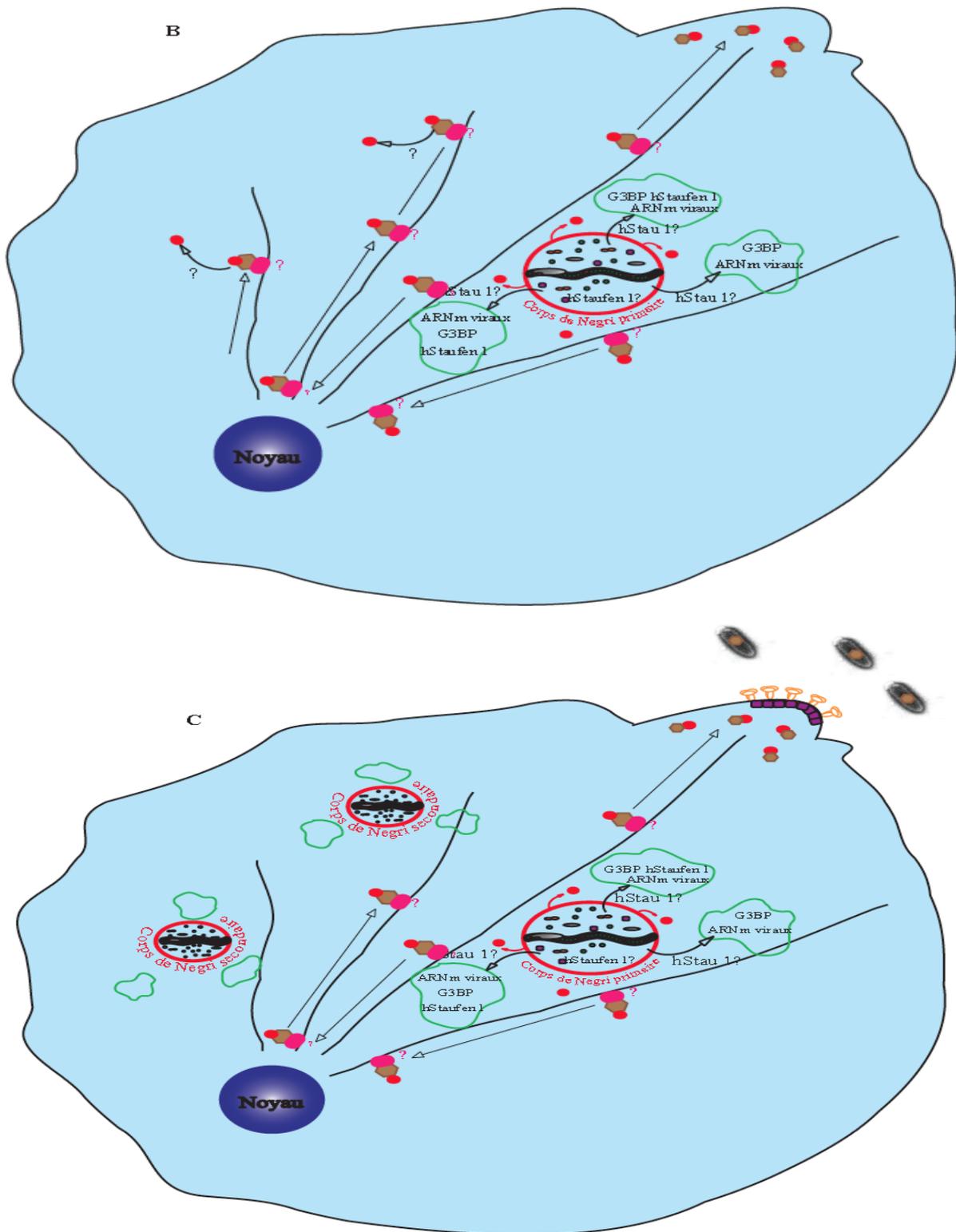


Figure 60 : Rôle de la protéine hStaufen 1 dans le cycle réplcatif du virus de la rage.

A : Induction granules de stress autour du CN primaire et projection de nucléocapsides

B : Transport des nucléocapsides via le réseau microtubulaire

C : Formation des CNs secondaires et bourgeonnement viral

I. Les Protéines eEF1A1, hnRNPH2 et TGFβ1I1

La protéine hStaufen 1 n'a pas été la seule protéine étudiée en tant que partenaire de la polymérase rabique. Dans une seconde partie de ma Thèse je me suis intéressé à trois autres protéines cellulaires partenaires, que le crible en double hybride avaient révélées. Nous les avons sélectionnées selon les critères indiqués précédemment. Elles devaient être : retrouvés au moins 2 fois dans le crible, si possible interagissant indépendamment avec différents fragments de la L; assurer des fonctions biologiques compatibles avec la réplication du virus de la rage ; avoir été impliquées dans le cycle répliatif d'autres virus. Suite à son succès sur la protéine Staufen, la méthode de diminution d'expression par shRNA porté par un vecteur lentiviral a été appliquée à ces partenaires. Cependant, la recherche ou le développement d'outils de détection et les étapes de validation et d'évaluation de la viabilité cellulaire après transduction n'ont pas permis de rechercher leur rôle aussi précisément que pour hStaufen 1. Ces trois partenaires sont :

- La protéine *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1* (eEF1A1)
- La protéine *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein* (hnRNPH2)
- La protéine *Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein* (TGFβ1I1)

La protéine *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1* (eEF1A1) :

La protéine *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1* (eEF1A1) appartient à la famille des facteurs d'élongation eucaryotes (eEFs) qui comprend deux groupes de protéines : eEF-2 et eEF-1, ce dernier étant subdivisé en deux sous-groupes : Alpha (α), dont fait parti notre protéine, et Beta/Gamma(β/γ). La protéine eEF1A1 est une GTPase et lie l'actine filamenteuse (F-actin) et les microtubules. Sa principale activité est de médier le recrutement des aminocyl-ARNt sur le site A de l'unité 80S du ribosome durant la synthèse protéique. Même si la protéine eEF1A1 n'a été retrouvée que 2 fois dans le crible double hybride avec la polymérase totale, ses rôles biologiques, en interaction avec d'autres virus rendent son étude attractive. En effet, elle joue notamment un rôle prédominant dans la

réplication du virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV), prototype des *Rhabdoviridae*, en se liant fortement à la polymérase.

La protéine *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNPH2)* :

La protéine *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNPH2)* appartient à la grande famille des *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPHs)* qui ont la capacité de lier l'ARN. Grâce à leurs domaines RRM (*RNA Recognition Motif*), elles s'associent aux pré-ARNm et influencent le processing, le métabolisme ou encore le transport des ARNm. La protéine hnRNPH2 a été retrouvée 3 fois avec la polymérase totale du virus de la rage. La protéine hnRNPH2 voit son expression diminuée lors d'une infection par le virus Nipah dans des cellules neuronales tandis qu'elle est augmentée durant une infection par le virus de la Dengue. Elle interagit alors avec les protéines structurales et non-structurales du virus afin d'optimiser sa réplication.

La protéine *Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein (TGFβ1I1)* :

La protéine *Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein (TGFβ1I1)* joue le rôle d'adaptateur moléculaire permettant l'interaction protéine-protéine au niveau des adhésions focales et dans le noyau. Elle régule et module les voies de signalisation et l'activité de nombreuses protéines au niveau de la membrane plasmique. Dans le noyau, elle joue le rôle de co-activateur des récepteurs androgènes et autres. La protéine TGFβ1I1 joue également un rôle dans la croissance, la prolifération, la migration, la différenciation et la senescence cellulaire. Elle présente une capacité de liaison à l'ADN Zinc-dépendante. Cette protéine a été retrouvée 37 fois avec la partie Cterminale de la polymérase rabique et quatre fois avec la polymérase totale, et bien qu'aucune relation n'ait été trouvée avec d'autres virus, le nombre important d'interaction durant le criblage de la banque m'a poussé à inclure cette protéine dans l'étude.

L'objectif de l'étude des partenaires cellulaires de la polymérase du virus de la rage est de mieux comprendre son fonctionnement et de mettre potentiellement en évidence les mécanismes cellulaires qu'elle utilise ou dont elle participe au détournement pour favoriser la mise en place de l'infection. L'identification de ces partenaires cellulaires pourrait offrir des cibles thérapeutiques pour la déstabilisation du complexe de réplication ayant l'avantage d'un échappement par mutation plus faible que les protéines virales ce qui demeure un point limitant dans le développement de thérapeutiques antivirales. En revanche, on peut s'attendre

à des effets secondaires pour le patient, à la hauteur du rôle et des fonctions biologiques que jouent ces protéines cellulaires.

Etant donné que le temps de cette Thèse ne m'a pas permis d'approfondir suffisamment le rôle de chacun des trois partenaires sélectionnés, j'ai choisi de présenter ci-après les différentes méthodes d'investigation que je leur ai appliquées et de comparer les résultats spécifiques obtenus pour chacun.

A. Validation de l'interaction par la méthode du Double Hybride :

La première étape de l'étude de ces protéines cellulaires a été de valider leur interaction par double hybride. Pour cela, la polymérase rabique totale et ses deux fragments Nter et Cter sont clonés dans un plasmide permettant leur fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4. D'autre part, chaque protéine cellulaire est séparément clonée dans un plasmide qui permet sa fusion avec le domaine d'activation de la protéine Gal4. Des constructions symétriques ont également été réalisées (polymérase - activateur de Gal4 / protéine – liaison ADN de Gal4) pour renforcer la réalité de l'interaction. Un des plasmides code la leucine, l'autre le tryptophane, deux acides aminés dont le milieu de culture est dépourvu pour sélectionner seulement les levures transfectées par les deux types de plasmides. Le milieu est également dépourvu d'histidine, acide aminé dont la synthèse est sous contrôle du promoteur Gal4 et qui n'est activé que lors de la reconstitution complète de Gal4 (Domaine de liaison + activation), c'est à dire lorsque la polymérase interagit avec son partenaire. Du 3AT (AminoTriazole) à 10mM, inhibiteur compétitif de l'histidine, permet en outre de ne sélectionner que les partenaires qui présentent une interaction forte, capable de synthétiser l'histidine de façon suffisante pour compenser cette compétition. Après la transfection des levures, elles sont incubées 96h à 30°C.

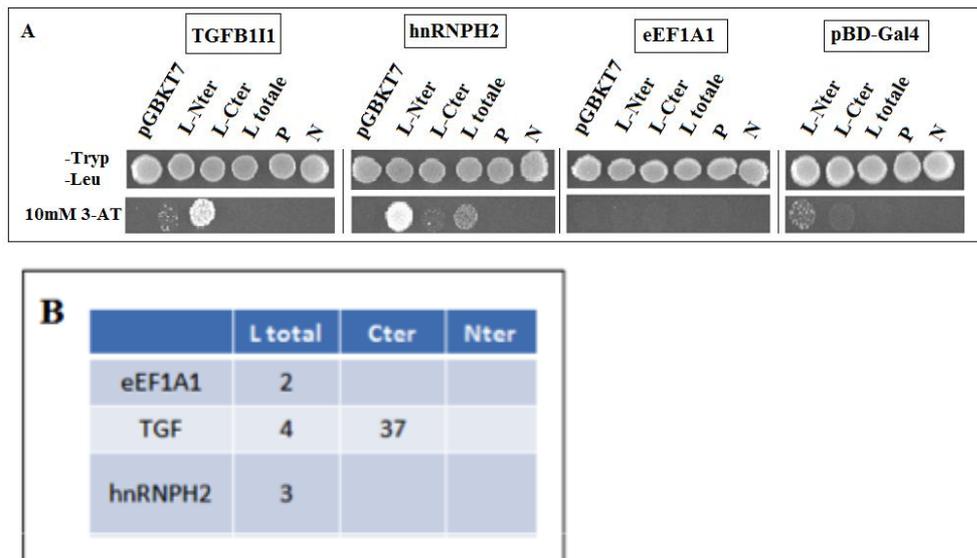


Figure 61 : (A) Interaction en double hybride des protéines TGF1I1, hnRNPH2 et eEF1A1 avec la polymérase de la souche PV du virus de la rage et ses fragments Nter et Cter ainsi qu'avec les protéines N et P. 10mM de 3AT permet d'éliminer les réactions d'auto-activation et de ne garder que les interactions spécifiques.

(B) Rappel du nombre d'interactions obtenues avec les trois protéines sélectionnées lors du criblage en double hybride de la banque d'ADNc de rate humaine.

La figure n°61 montre que les résultats ne sont que partiellement en accord avec ceux du crible double hybride. Ceci n'est pas surprenant considérant qu'une banque de cDNA ne recouvre parfois qu'une portion de la protéine partenaire. En revanche, la validation des partenaires est une confrontation directe entre protéines complètes, telles qu'elles doivent exister dans la cellule. Ainsi, la protéine hnRNPH2 qui n'avait été retrouvée qu'avec la polymérase totale, présente une forte affinité pour le fragment Nterminal en confrontation directe. La protéine TGF1I1, quant à elle, présente le même profil d'interaction que celui trouvé dans le crible, elle interagit fortement avec le fragment Cterminal. Enfin, la protéine eEF1A1 n'interagit ni avec la protéine L totale, ni avec aucun de ses fragments. Cette absence d'interaction peut s'expliquer de deux façons : (1) 10mM de 3AT est trop restrictif pour que l'on puisse observer l'interaction qui serait alors considérée comme faible, ou (2) l'interaction entre les deux partenaires nécessite la formation d'un complexe protéique.

Ces résultats nous ont néanmoins confortés dans l'idée que ces protéines sont des partenaires de la polymérase rabique, avec parfois de nouvelles indications sur la région de la L responsable de l'interaction. L'étude plus poussée de l'identification des régions minimales responsables de l'interaction, comme nous l'avons fait dans le cas de la protéine hStaufen 1 serait une première étape pour mieux comprendre les relations protéine-protéines et nous aiguiller vers les mécanismes enzymatiques dans lesquels ces partenaires sont impliqués.

B. Etude des interactions par imagerie cellulaire

Pour observer les interactions dans les cellules HEK293T et SK-N-SH infectées ou non avec le virus de la rage, nous avons d'abord cloné chaque partenaire dans un plasmide permettant de le tagger avec la GFP en Nterminal. Mais l'observation des GFP-protéines ainsi que leur interaction avec les Corps de Negri (CNs) s'est avérée complexe, possiblement en raison d'une surexpression des plasmides et du tag GFP. Nous avons donc pris l'option d'observer les interactions en immunomarquant les protéines endogènes. Il est à noter que nous avons mis beaucoup de temps à identifier des anticorps commerciaux spécifiques des protéines partenaires et fonctionnant en immunofluorescence et/ou Western Blot.

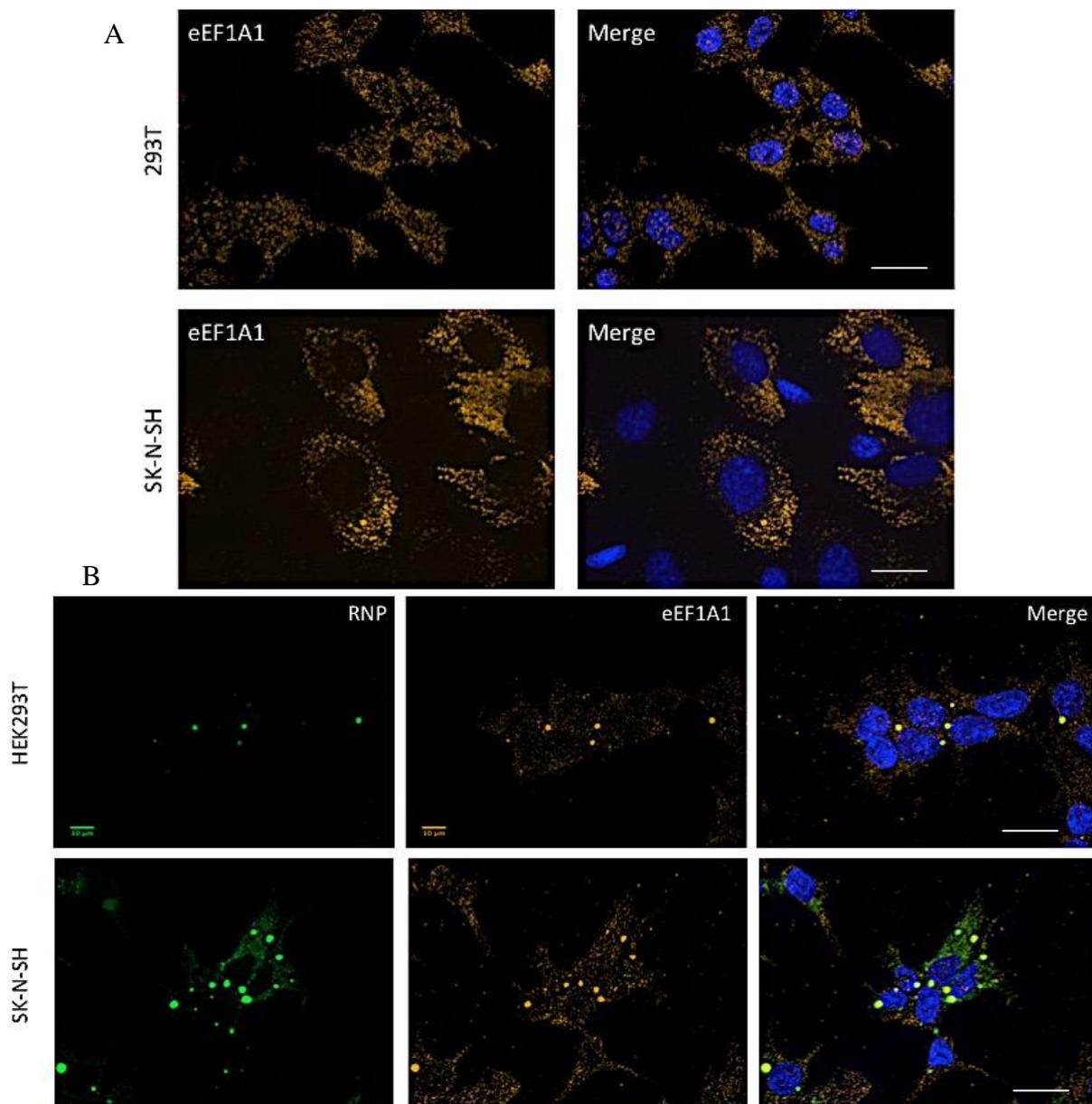
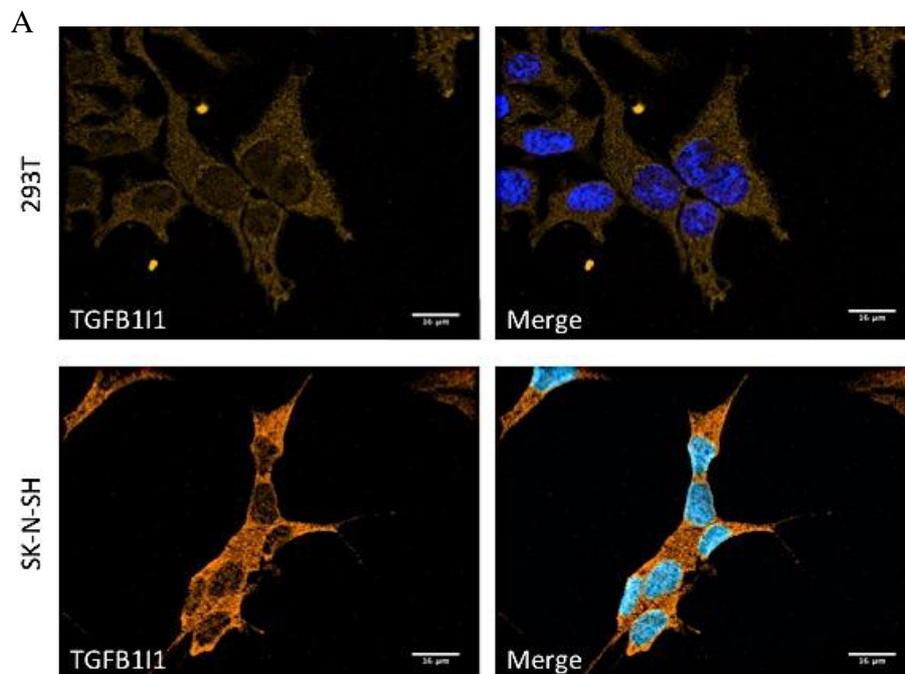


Figure 62 : Observation de la protéine eEF1A1 dans les cellules HEK293T et SK-N-SH non infectées (A) et après infection par virus de la rage (B)

(A) Les cellules sont fixées puis immunomarquées avec un anticorps anti eEF1A1 (orange) afin de visualiser la protéine eEF1A1 endogène. Les noyaux sont colorés par le Hoechst.

(B) Les cellules sont infectées par la souche PV du virus de la rage à MOI 2 puis fixées à 24h post infection. Les RNPs et la protéine eEF1A1 endogène sont immunomarquées par des anticorps anti-N (vert) et anti-eEF1A1 (orange). Les noyaux sont colorés par le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 16µm.

La figure n°62 montre que la protéine eEF1A1 se présente sous forme de granulations cytoplasmiques diffuses dans les cellules HEK293T et SK-N-SH non infectées (Cf.fig62.A). Cette disposition est conservée dans les cellules HEK293T et SK-N-SH 24h post-infection (Cf.fig62.B), mais colocalise en outre très clairement avec les CNs ce qui confirme son interaction avec une/des protéine(s) rabique(s) présentes dans les CNs, probablement la L.



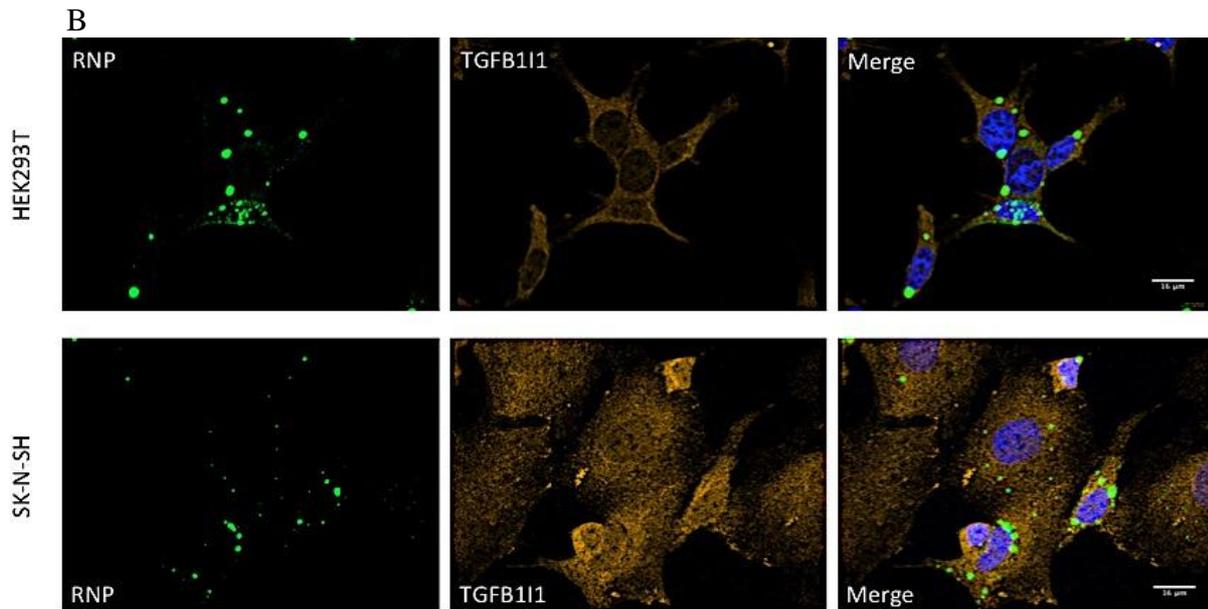


Figure 63 : Observation de la protéine TGFβ1I1 dans les cellules HEK293T et SK-N-SH non infectées (A) et après infection par virus de la rage (B)

(A) Les cellules sont fixées puis immunomarquées avec un anticorps anti-TGFβ1I1 (orange) afin d'observer la protéine endogène.

(B) Les cellules sont infectées par la souche PV du virus de la rage à MOI 2 puis fixées à 24h post infection. Les RNPs et la protéine TGFβ1I1 endogène sont révélées par immunomarquage anti-N (vert) et anti-TGFβ1I1. Les noyaux sont colorés par le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 16μm.

La figure n°63 montre une localisation cytoplasmique diffuse de la protéine TGF β1I1 dans les cellules HEK293T et SK-N-SH (Cf.fig63.A) En revanche, aucune réorganisation ou colocalisation n'est observée avec la protéine TGFβ1I1 dont la distribution diffuse dans le cytoplasme n'est pas modifiée en présence des CNs et avec lesquels elle ne co-localise pas (Cf.fig63.B). Nous n'avons malheureusement pas été en mesure d'obtenir des anticorps capable d'établir un immunomarquage par immunofluorescence satisfaisant pour la protéine hnRNPH2.

De même que pour le double hybride, il serait pertinent d'établir un protocole d'observation propre à chaque partenaire cellulaire en fonction de son rôle dans le cycle répliatif rabique. Une cinétique d'infection pourrait permettre de mieux encadrer l'/les étapes dans lesquelles l'interaction est nécessaire.

C. Effet de la diminution d'expression des partenaires de la polymérase rabique sur l'infection

La diminution de l'expression de chaque partenaire a été réalisée par (1) la sélection spécifique de siRNA ; (2) le clonage de ces siRNAs, sous forme de shRNAs dans un vecteur lentiviral ; (3) la transduction des cellules par le vecteur et analyse du phénotype des cellules transduites, comme précisément décrit dans le chapitre sur la protéine hStaufen 1. Nous avons ainsi cherché à établir des clones cellulaires dans les cellules HEK293T où les shRNAs sont exprimés de manière stable, nous permettant ainsi d'étudier l'effet de cette perturbation sur le cycle réplcatif du virus de la rage. Pour les SK-N-SH en revanche, seules des populations transduites de façon hétérogène ont pu être obtenues.

Nous avons d'abord validé la diminution d'expression des protéines partenaires par Western Blot dans nos deux types cellulaires (HEK293T et SK-N-SH) et évalué l'effet de cette diminution sur les protéines virales après infection.

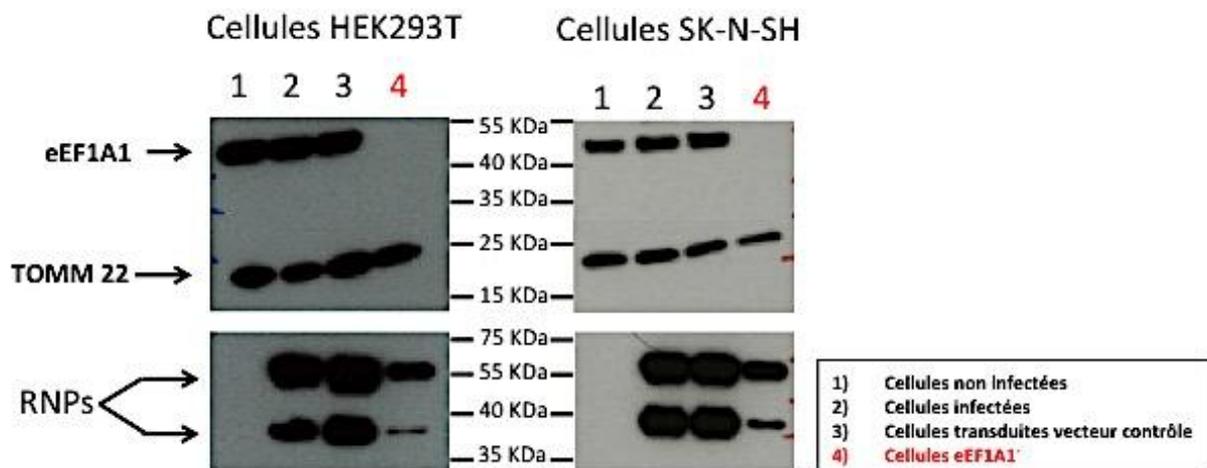


Figure 64 : Effet de la diminution d'expression de la protéine eEF1A1 des cellules HEK293T et SK-N-SH sur les protéines rabiques intracellulaires.

Les cellules contrôles (non transduites) sont non infectées (1) ou infectées (2). Les clones (HEK293T) ou les populations (SK-N-SH) cellulaires sont transduites avec le vecteur contrôle sans shRNA (3) ou le vecteur portant le shRNA dirigé contre la protéine eEF1A1 (4). Les cellules sont infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 2. 24h post infection des extraits cellulaires sont réalisés et analysés par Western Blot avec des anticorps anti-eEF1A1, anti-RNP et anti-TOMM22.

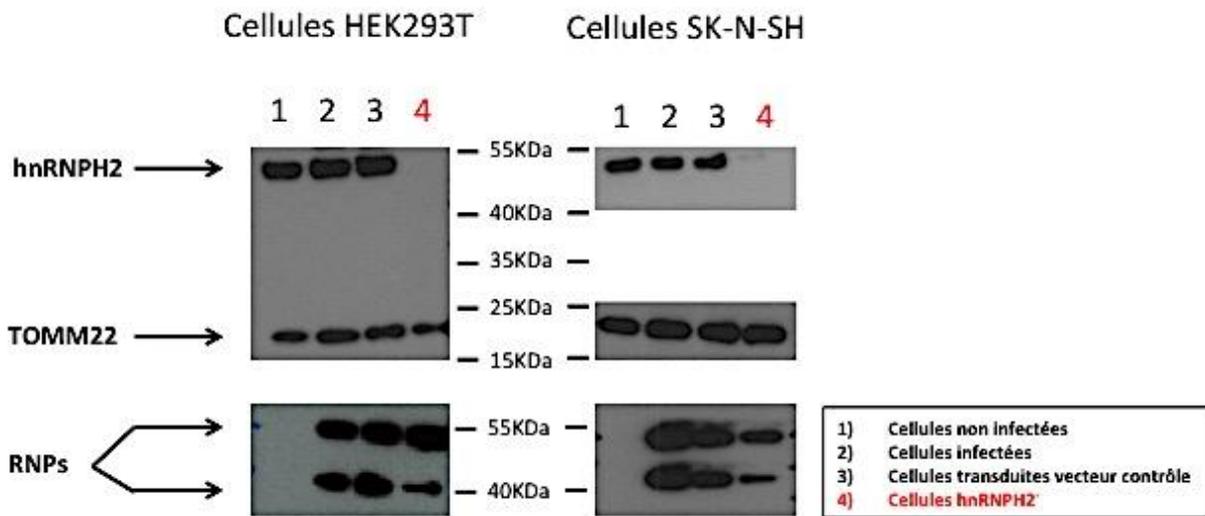


Figure 65 : Effet de la diminution d'expression de la protéine hnRNPH2 des cellules HEK293T et SK-N-SH sur les protéines rabiques intracellulaires.

Les cellules contrôles (non transduites) sont non infectées (1) ou infectées (2). Les clones (HEK293T) ou les populations (SK-N-SH) cellulaires sont transduites avec le vecteur contrôle sans shRNA (3) ou le vecteur portant le shRNA dirigé contre la protéine hnRNPH2 (4). Les cellules sont infectées avec la souche PV du virus rabiques à MOI 2. 24h post infection des extraits cellulaires sont réalisés et analysés par Western Blot avec des anticorps anti-hnRNPH2, anti-RNP et anti-TOMM22.

Les figures n°64 et n°65 montrent que la diminution d'expression des protéines eEF1A1 et hnRNPH2 est très efficace aussi bien dans les cellules HEK293T que dans les SK-N-SH. Elle est aussi non délétère pour les cellules car la protéine TOMM 22 n'est pas diminuée. Cette diminution influe négativement l'expression des protéines de la RNP rabique avec une concentration intracellulaire moindre que dans les conditions contrôles. L'effet de la diminution d'expression de eEF1A1 semble être identique dans les deux types cellulaires (Cf.fig64), tandis que pour la diminution d'expression de hnRNPH2 une diminution de la détection des RNPs est plus importante dans les cellules SK-N-SH (Cf.fig65).

Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir d'anticorps fonctionnels permettant de visualiser et donc de valider la diminution d'expression de la protéine TGFβ1I1 par Western Blot. Nous avons néanmoins réalisé un Western Blot « à l'aveugle », sans connaître le niveau de diminution d'expression de la protéine TGFβ1I1, et aucun effet n'a été observé sur l'accumulation des RNPs intracellulaires (non montré).

Enfin, la diminution d'expression de la protéine eEF1A1 a été validée par immunofluorescence (Cf.fig66) montrant que la protéine est moins présente dans le cytoplasme (comparer avec la Figure n°62.A). Elle semble entraîner un retard significatif dans la formation des CNs. Effet en comparaison avec la figure n°62.B, qui montre également une infection rabique à MOI identique au bout de 24h, un faible nombre de CNs est observé avec une taille inférieure aux CNs dans les cellules contrôles que ce soit dans les cellules HEK293T et SK-N-SH.

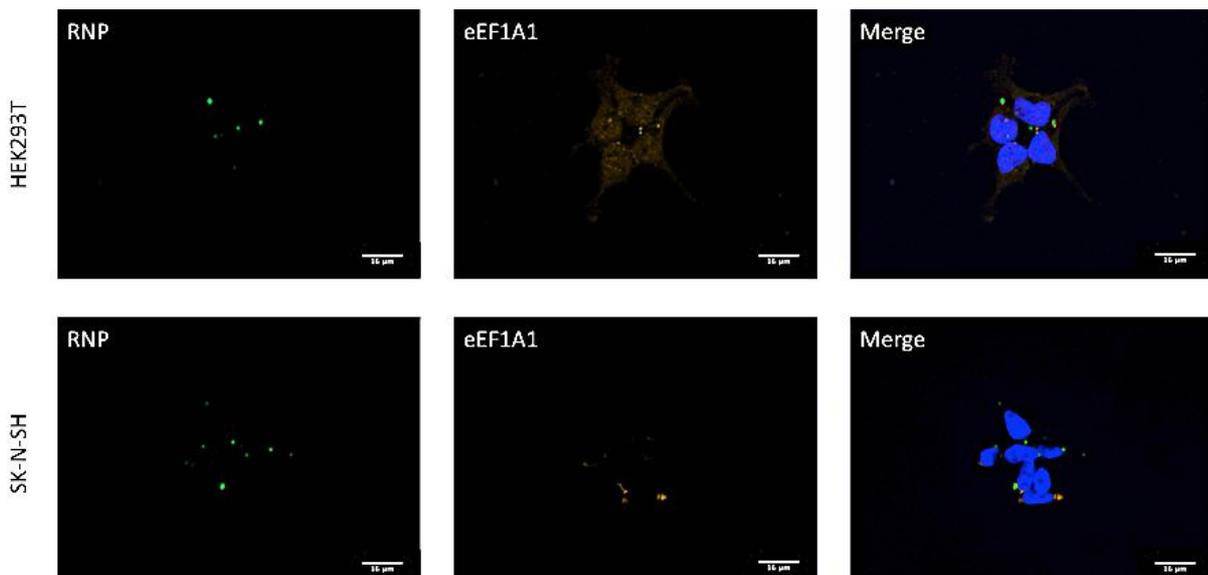


Figure 66 : Effet de la diminution d'expression de la protéine eEF1A1 sur l'établissement des Corps de Negri

Les cellules HEK293T issues d'un clone cellulaire transduit de façon stable avec le vecteur lentiviral portant le shRNA ciblant la protéine eEF1A1 ainsi que les cellules SK-N-SH issues d'une population cellulaire transduite de façon transitoire (2 MOT de vecteur) sont infectées par la souche PV du virus rabique à MOI 2 puis fixées à 24h post infection. Les RNPs et la protéine eEF1A1 endogène sont révélées par immunomarquage avec un anticorps anti-N (vert) et anti-eEF1A1 (orange). Les noyaux sont colorés par le Hoechst. La barre d'échelle correspond à 16μm.

Au total, nos échecs de visualisation de la protéine hnRNPH2 en immunofluorescence et de contrôle d'une diminution d'expression de la protéine TGFβ111 par Western Blot ne nous permettent pas de conclure sur leur rôle lors de l'infection rabique et notamment dans la mise en place des CNs. L'obtention d'autres outils d'observation et de détection sont nécessaires à ce stade.

En fait, seule la protéine eEF1A1 a donné des résultats en immunofluorescence et en Western Blot. Ils suggèrent un rôle de cette protéine au niveau des CNs, usines virales du virus de la rage, dans leur mise en place et/ou la synthèse des protéines virales. La diminution d'expression de la protéine hnRNPH2 montre également un rôle de ce partenaire dans la production de protéine virale mais ne nous permet pas de dire si cela est dû à une perturbation du complexe polymérase ou à un effet dans l'établissement des CNs ou autre.

D. Effet de la diminution d'expression des partenaires sur l'activité de la polymérase rabique

Nous avons transduit des cellules HEK293T-T7 par les shRNA spécifiques des protéines eEF1A1 ou hnRNPH2, et utilisé le système du miniréplicon sur les cellules transduites pour évaluer l'effet de la diminution d'expression sur les activités enzymatiques (transcription et réplication) de la polymérase du virus de la rage.

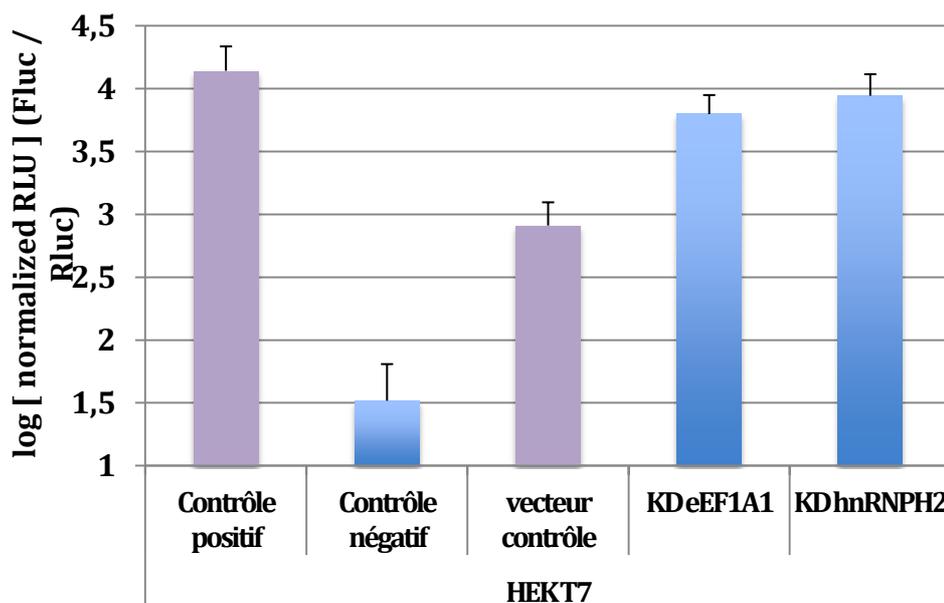


Figure 67 : La diminution d'expression des protéines eEF1A1 et TGFβ111 n'impacte pas les activités de transcription et de réplication de la polymérase rabique

Les cellules HEK293T/T7 sont transduites avec les vecteurs contrôles, ou exprimant les shRNA eEF1A1 (KD eEF1A1) ou shRNA hnRNPH2 (KD hnRNPH2) à MOT 5. A 72 heures post transduction, les cellules sont transfectées avec les plasmides pN, pP, pL, pLuciférase et pRénillia. A 48h post transfection des extraits cellulaires sont réalisés et analysés par luminescence selon le protocole du kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega).

La figure n°67 montre que la diminution d'expression des protéines eEF1A1 et hnRNPH2 ne perturbe pas les activités enzymatiques de la polymérase du virus de la rage dans le contexte du miniréplicon. Ainsi, la moindre quantité de RNPs intracellulaires observée antérieurement suite à la diminution d'expression de ces protéines ne semble pas provenir d'une inhibition des activités de la polymérase mais pourrait plutôt jouer sur une autre étape. Par exemple sur le mécanisme utilisé pour la mise en place des CNs puisque la protéine eEF1A1 y est recrutée durant l'infection. Notre hypothèse serait que la déstabilisation de la composition des CNs entraînerait une perturbation dans leur formation et donc dans leur rôle d'usine virale.

E. Effet de la diminution d'expression des partenaires sur le relargage de virion rabique dans le surnageant

Nous avons infectés des cellules HEK293T contrôles (non transduites ou transduites avec le vecteur contrôle sans shRNA) ou les clones cellulaires eEF1A1 KD et hnRNPH2 KD réprimant les protéines correspondantes avec la souche PV du virus rabique à MOI 2 pendant 24 heures. Les surnageants cellulaires sont clarifiés puis déposés selon une gamme de dilution décroissante sur un tapis de cellules BSR. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont fixées puis immunomarquées avec un anticorps anti-N afin de quantifier les corps de Negri. Nous avons suivi la production virale lors de la diminution d'expression des protéines eEF1A1 et hnRNPH2 par quantification de particules infectieuses.

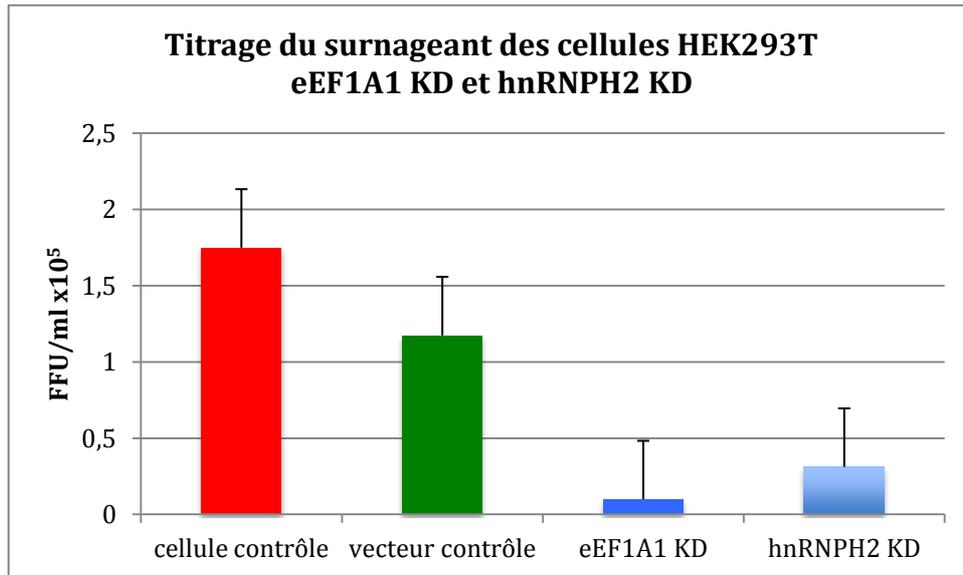


Figure 68 : Effet de la diminution d'expression des protéines eEF1A1 et hnRNPH2 sur la production des particules virales

Les cellules HEK293T non transduites (contrôle) ou transduites de façon stable par un vecteur vide (vecteur contrôle) ou codant un shRNA ciblant les protéines eEF1A1 (eEF1A1 KD) ou hnRNPH2 (hnRNPH2 KD) sont infectées avec la souche PV du virus rabique à MOI 2. 24 heures post infection le surnageant des cellules est déposé sur un tapis de cellule BSR en dilution croissante. Les cellules BSR sont fixées 24 heures post infection puis immunomarquées avec un anti-N afin de visualiser les CNs pour les quantifier et déterminer le titre infectieux.

La figure n°68 montre que la transduction des cellules HEK293T par un vecteur contrôle ne perturbe que faiblement la production de particules virales infectieuses par rapport aux cellules contrôles non transduites. En revanche, il est clairement visible que la diminution d'expression des protéines eEF1A1 et hnRNPH2 inhibe cette production d'un facteur de 70% environ.

Une RT-QPCR pour quantifier l'ARN génomique et anti-génomique relargués dans le surnageant afin d'observer la production virale totale a été réalisée lors de la rédaction de ce manuscrit et n'y sont donc pas inclus.

F. Discussion

Tableau récapitulatif des résultats obtenu pour les partenaires cellulaires eEF1A1, hnRNPH2 et TGFβ1I1

Technique d'analyse	eEF1A1	hnRNPH2	TGFβ1I1
Crible double hybride	∅	Interaction avec la polymérase totale et le fragment Nterminal	Interaction avec la polymérase totale et le fragment Cterminal
Immunofluorescence en cellule contrôle (HEK293T et SK-N-SH)	Localisation cytoplasmique sous forme granulaire et colocalisation avec les CNs	∅	Localisation cytoplasmique diffuse sans colocalisation avec les CNs et réarrangement suite à l'infection
Immunofluorescence en cellule transduite (shRNA eEF1A1 ou hnRNPH2)	Diminution du nombre et de la taille des CNs	∅	∅
Western Blot	Régulation négative des RNPs intracellulaires dans les deux types cellulaires (HEK293T et SK-N-SH)	Régulation négative des RNPs intracellulaires dans les deux types cellulaires (HEK293T et SK-N-SH), avec un effet plus important pour les SK-N-SH	∅
Miniréplicon	Aucun impact sur les activités enzymatiques de la polymérase	Aucun impact sur les activités enzymatiques de la polymérase	∅
Titrage surnageant	Baisse du pouvoir infectieux des cellules HEK293T et SK-N-SH transduites avec le shRNA eEF1A1	Baisse du pouvoir infectieux des cellules HEK293T et SK-N-SH transduites avec le shRNA hnRNPH2	∅

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les protéines eEF1A1, hnRNPH2 et TGFβ1I1

L'établissement d'un crible double hybride ou toute autre technique permettant l'identification de partenaires cellulaires de protéines virales est un axe de recherche prometteur. Il permet à la fois l'étude de protéine dont on ne soupçonnerait pas le rôle et la découverte de mécanismes viraux constituant idéalement des cibles à large spectre. Toutefois, l'identification de partenaires cellulaires d'une protéine virale peut amener à étudier des protéines cellulaires pour lesquelles les outils biologiques peuvent manquer ou être inefficaces. Cela peut considérablement limiter le champ d'étude et d'investigation de ces protéines et poser des freins quant à l'établissement de leur rôle dans le cycle réplcatif viral étudié. En contrepoint, cela peut également ouvrir à de nouvelles études d'autres virus de la même famille que celle du virus qui a permis d'identifier les partenaires.

L'étude des protéines eEF1A1, hnRNPH2 et TGFβ1I1 constitue une recherche complémentaire de ma thèse en dehors de l'étude plus avancée de la protéine hStaufen 1, afin d'identifier des partenaires de la polymérase du virus de la rage pouvant conduire à un ciblage thérapeutique. Nous avons pu établir une diminution d'expression pour les protéines eEF1A1, hnRNPH2 grâce à l'obtention de clones cellulaires HEK293T transduits de façon stable ce qui permet une expérimentation plus facile, car le niveau d'inhibition reste stable au cours du temps. Même si elles ne sont pas des cellules neuronales, qui sont les partenaires naturels, du virus de la rage *in vivo*, les cellules HEK293T constituent un modèle d'étude de choix pour explorer le rôle des partenaires cellulaires dans le cycle répliquatif rabique.

De ce point de vue, les protéines eEF1A1 et hnRNPH2 sont des candidats intéressants même si tous les outils ne sont pas aujourd'hui disponibles pour étudier leur rôle de façon détaillée :

Après hStaufen 1, eEF1A1 a été la mieux étudiée durant cette thèse. Elle colocalise clairement avec les corps de Negri ce qui suggère qu'elle puisse jouer un rôle dans leur établissement voire dans leur maturation. En effet, sa diminution inhibe non seulement leur nombre et leur taille, mais aussi la production des protéines virales de la RNP et des particules virales infectieuses relarguées.

La protéine hnRNPH2 apparaît également comme un partenaire nécessaire du virus de la rage puisque sa diminution inhibe aussi la production des protéines de la RNP et le relargage des virions. L'effet sur la production des protéines intracellulaires n'est toutefois pas de même niveau dans les deux types cellulaires avec un impact négatif plus élevé dans les SK-N-SH. Le recrutement d'un même partenaire cellulaire dans deux types cellulaires différents n'est peut être pas requis pour les mêmes mécanismes. Toutefois, l'absence d'un anticorps spécifique efficace pour l'immunofluorescence empêche de précisément étudier son effet sur les corps de Negri et d'identifier des rôles différents d'un type cellulaire à l'autre.

Enfin, la protéine TGFβ1I1 s'avère pour le moment la moins prometteuse en dépit de sa très forte interaction avec la polymérase complète (quatre fois) et surtout son fragment C-terminal (37 fois) (Cf.fig61). Même si nous n'avons pas obtenu d'anticorps permettant d'évaluer sa diminution dans les cellules transduites, celles-ci ne montrent aucune diminution des protéines de la RNP et la protéine TGFβ1I1 ne montre aucune colocalisation ou condensation à proximité des Corps de Negri.

En conclusion, une étude au cas par cas plus approfondie de ces différents nous permettrait de mieux comprendre leur rôle comme partenaire de la polymérase rabique et leur implication dans le cycle répliatif du virus de la rage. Des cinétiques d'infection pourraient être réalisées afin d'identifier plus précisément les étapes auxquelles les interactions sont requises. En outre, une dissection en double hybride similaire à celle réalisée pour hStaufen 1 permettrait d'identifier les régions responsables de l'interaction pour chacun des partenaires.

Bibliographie

Abrahamyan, L. G., L. Chatel-Chaix, L. Ajamian, M. P. Milev, A. Monette, J. F. Clement, R. Song, M. Lehmann, L. DesGroseillers, M. Laughrea, G. Boccaccio and A. J. Mouland (2010). "Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA." *J Cell Sci* **123**(Pt 3): 369-383.

Albertini, A. A., A. K. Wernimont, T. Muziol, R. B. Ravelli, C. R. Clapier, G. Schoehn, W. Weissenhorn and R. W. Ruigrok (2006). "Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex." *Science* **313**(5785): 360-363.

Amarasinghe, G. K., N. G. Arechiga Ceballos, A. C. Banyard, C. F. Basler, S. Bavari, A. J. Bennett, K. R. Blasdel, T. Briese, A. Bukreyev, Y. Cai, C. H. Calisher, C. Campos Lawson, K. Chandran, C. A. Chapman, C. Y. Chiu, K. S. Choi, P. L. Collins, R. G. Dietzgen, V. V. Dolja, O. Dolnik, L. L. Domier, R. Durrwald, J. M. Dye, A. J. Easton, H. Ebihara, J. E. Echevarria, A. R. Fooks, P. B. H. Formenty, R. A. M. Fouchier, C. M. Freuling, E. Ghedin, T. L. Goldberg, R. Hewson, M. Horie, T. H. Hyndman, D. Jiang, R. Kityo, G. P. Kobinger, H. Kondo, E. V. Koonin, M. Krupovic, G. Kurath, R. A. Lamb, B. Lee, E. M. Leroy, P. Maes, A. Maisner, D. A. Marston, S. K. Mor, T. Muller, E. Muhlberger, V. M. N. Ramirez, S. V. Netesov, T. F. F. Ng, N. Nowotny, G. Palacios, J. L. Patterson, J. T. Paweska, S. L. Payne, K. Prieto, B. K. Rima, P. Rota, D. Rubbenstroth, M. Schwemmler, S. Siddell, S. J. Smither, Q. Song, T. Song, M. D. Stenglein, D. M. Stone, A. Takada, R. B. Tesh, L. M. Thomazelli, K. Tomonaga, N. Tordo, J. S. Towner, N. Vasilakis, S. Vazquez-Moron, C. Verdugo, V. E. Volchkov, V. Wahl, P. J. Walker, D. Wang, L. F. Wang, J. F. X. Wellehan, M. R. Wiley, A. E. Whitfield, Y. I. Wolf, G. Ye, Y. Z. Zhang and J. H. Kuhn (2018). "Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018." *Arch Virol* **163**(8): 2283-2294.

Bauer, A., T. Nolden, J. Schroter, A. Romer-Oberdorfer, S. Gluska, E. Perlson and S. Finke (2014). "Anterograde glycoprotein-dependent transport of newly generated rabies virus in dorsal root ganglion neurons." *J Virol* **88**(24): 14172-14183.

Belanger, G., M. A. Stocksley, M. Vandromme, L. Schaeffer, L. Furic, L. DesGroseillers and B. J. Jasmin (2003). "Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction." *J Neurochem* **86**(3): 669-677.

Benmansour, A., H. Leblois, P. Coulon, C. Tuffereau, Y. Gaudin, A. Flamand and F. Lafay (1991). "Antigenicity of rabies virus glycoprotein." *J Virol* **65**(8): 4198-4203.

Besson, B., F. Sonthonnax, M. Duchateau, Y. Ben Khalifa, F. Larrous, H. Eun, V. Hourdel, M. Matondo, J. Chamot-Rooke, R. Grailhe and H. Bourhy (2017). "Regulation of NF-kappaB by the p105-ABIN2-TPL2 complex and RelAp43 during rabies virus infection." *PLoS Pathog* **13**(10): e1006697.

Blondel, D., S. Kheddache, X. Lahaye, L. Dianoux and M. K. Chelbi-Alix (2010). "Resistance to rabies virus infection conferred by the PMLIV isoform." *J Virol* **84**(20): 10719-10726.

Blondel, D., T. Regad, N. Poisson, B. Pavie, F. Harper, P. P. Pandolfi, H. De The and M. K. Chelbi-Alix (2002). "Rabies virus P and small P products interact directly with PML and reorganize PML nuclear bodies." *Oncogene* **21**(52): 7957-7970.

Bourhy, H., B. Kissi and N. Tordo (1993). "Molecular diversity of the Lyssavirus genus." *Virology* **194**(1): 70-81.

Brendza, R. P., L. R. Serbus, J. B. Duffy and W. M. Saxton (2000). "A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein." *Science* **289**(5487): 2120-2122.

Bregues, M., D. Teixeira and R. Parker (2005). "Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies." *Science* **310**(5747): 486-489.

Brizard, F., M. Luo and L. Desgroseillers (2000). "Genomic organization of the human and mouse stau genes." *DNA Cell Biol* **19**(6): 331-339.

Bronnert, J., H. Wilde, V. Tepsumethanon, B. Lumlertdacha and T. Hemachudha (2007). "Organ transplantations and rabies transmission." *J Travel Med* **14**(3): 177-180.

Brunel, C. and C. Ehresmann (2004). "Secondary structure of the 3' UTR of bicoid mRNA." *Biochimie* **86**(2): 91-104.

Buchan, J. R. and R. Parker (2009). "Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation." *Mol Cell* **36**(6): 932-941.

Buchner, G., M. T. Bassi, G. Andolfi, A. Ballabio and B. Franco (1999). "Identification of a novel homolog of the Drosophila stau protein in the chromosome 8q13-q21.1 region." *Genomics* **62**(1): 113-118.

Buthelezi, S. G., H. W. Dirr, E. Chakauya, R. Chikwamba, L. Martens, T. L. Tsekoa, S. H. Stoychev and E. Vandermarliere (2016). "The Lyssavirus glycoprotein: A key to cross-immunity." *Virology* **498**: 250-256.

Bycroft, M., S. Grunert, A. G. Murzin, M. Proctor and D. St Johnston (1995). "NMR solution structure of a dsRNA binding domain from Drosophila stau protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5." *EMBO J* **14**(14): 3563-3571.

Castel, G., M. Chteoui, G. Caignard, C. Prehaud, S. Mehoulas, E. Real, C. Jallet, Y. Jacob, R. W. Ruigrok and N. Tordo (2009). "Peptides that mimic the amino-terminal end of the rabies virus phosphoprotein have antiviral activity." *J Virol* **83**(20): 10808-10820.

Ceccaldi, P. E., M. P. Fillion, A. Ermine, H. Tsiang and G. Fillion (1993). "Rabies virus selectively alters 5-HT1 receptor subtypes in rat brain." *Eur J Pharmacol* **245**(2): 129-138.

Chatel-Chaix, L., L. Abrahamyan, C. Frechina, A. J. Mouland and L. DesGroseillers (2007). "The host protein Stau1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization." *J Virol* **81**(12): 6216-6230.

Chatel-Chaix, L., K. Boulay, A. J. Mouland and L. Desgroseillers (2008). "The host protein Stau1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus." *Retrovirology* **5**: 41.

Chatel-Chaix, L., J. F. Clement, C. Martel, V. Beriault, A. Gatignol, L. DesGroseillers and A. J. Mouland (2004). "Identification of Stau1 in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles." *Mol Cell Biol* **24**(7): 2637-2648.

Chelbi-Alix, M. K., A. Vidy, J. El Bougrini and D. Blondel (2006). "Rabies viral mechanisms to escape the IFN system: the viral protein P interferes with IRF-3, Stat1, and PML nuclear bodies." *J Interferon Cytokine Res* **26**(5): 271-280.

Chen, B. J. and R. A. Lamb (2008). "Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT?" *Virology* **372**(2): 221-232.

Chenik, M., K. Chebli and D. Blondel (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**(2): 707-712.

Chenik, M., M. Schnell, K. K. Conzelmann and D. Blondel (1998). "Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein." *J Virol* **72**(3): 1925-1930.

Conti, C., F. Superti and H. Tsiang (1986). "Membrane carbohydrate requirement for rabies virus binding to chicken embryo related cells." *Intervirology* **26**(3): 164-168.

Davis, B. M., G. F. Rall and M. J. Schnell (2015). "Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask)." *Annu Rev Virol* **2**(1): 451-471.

de Lucas, S., J. Peredo, R. M. Marion, C. Sanchez and J. Ortin (2010). "Human Staufen1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus multiplication." *J Virol* **84**(15): 7603-7612.

Decroly, E., F. Ferron, J. Lescar and B. Canard (2011). "Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA." *Nat Rev Microbiol* **10**(1): 51-65.

Desfosses, A., E. A. Ribeiro, Jr., G. Schoehn, D. Blondel, D. Guilligay, M. Jamin, R. W. Ruigrok and I. Gutsche (2013). "Self-organization of the vesicular stomatitis virus nucleocapsid into a bullet shape." *Nat Commun* **4**: 1429.

Di Nunzio, F., A. Danckaert, T. Fricke, P. Perez, J. Fernandez, E. Perret, P. Roux, S. Shorte, P. Charneau, F. Diaz-Griffero and N. J. Arhel (2012). "Human nucleoporins promote HIV-1 docking at the nuclear pore, nuclear import and integration." *PLoS One* **7**(9): e46037.

Dochow, M., S. A. Krumm, J. E. Crowe, Jr., M. L. Moore and R. K. Plemper (2012). "Independent structural domains in paramyxovirus polymerase protein." *J Biol Chem* **287**(9): 6878-6891.

Doe, C. Q. (1992). "Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the Drosophila central nervous system." *Development* **116**(4): 855-863.

Driever, W., V. Siegel and C. Nusslein-Volhard (1990). "Autonomous determination of anterior structures in the early Drosophila embryo by the bicoid morphogen." *Development* **109**(4): 811-820.

Duchaine, T., H. J. Wang, M. Luo, S. V. Steinberg, I. R. Nabi and L. DesGroseillers (2000). "A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes." *Mol Cell Biol* **20**(15): 5592-5601.

Duchaine, T. F., I. Hemraj, L. Furic, A. Deitinghoff, M. A. Kiebler and L. DesGroseillers (2002). "Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles." *J Cell Sci* **115**(Pt 16): 3285-3295.

Dugre-Brisson, S., G. Elvira, K. Boulay, L. Chatel-Chaix, A. J. Mouland and L. DesGroseillers (2005). "Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs." *Nucleic Acids Res* **33**(15): 4797-4812.

Duncan, J. E. and R. Warrior (2002). "The cytoplasmic dynein and kinesin motors have interdependent roles in patterning the Drosophila oocyte." *Curr Biol* **12**(23): 1982-1991.

Duprex, W. P., F. M. Collins and B. K. Rima (2002). "Modulating the function of the measles virus RNA-dependent RNA polymerase by insertion of green fluorescent protein into the open reading frame." *J Virol* **76**(14): 7322-7328.

Emerson, S. U. (1982). "Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome." *Cell* **31**(3 Pt 2): 635-642.

Emerson, S. U. and Y. Yu (1975). "Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus." *J Virol* **15**(6): 1348-1356.

Everett, R. D. and M. K. Chelbi-Alix (2007). "PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence." *Biochimie* **89**(6-7): 819-830.

Fa-Hui, N., Y. Hai-Feng, Q. Rui-Feng, L. Xin and W. Cai-Bin (2008). "Characterization of a novel transcript variant of human STAU1 gene." *Acta Biochim Pol* **55**(3): 473-478.

Falcon, A. M., P. Fortes, R. M. Marion, A. Beloso and J. Ortin (1999). "Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro." Nucleic Acids Res **27**(11): 2241-2247.

Ferrandon, D., L. Elphick, C. Nusslein-Volhard and D. St Johnston (1994). "Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner." Cell **79**(7): 1221-1232.

Ferrandon, D., I. Koch, E. Westhof and C. Nusslein-Volhard (1997). "RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles." EMBO J **16**(7): 1751-1758.

Ferrer-Orta, C., A. Arias, C. Escarmis and N. Verdaguier (2006). "A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases." Curr Opin Struct Biol **16**(1): 27-34.

Finke, S. and K. K. Conzelmann (1997). "Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions." J Virol **71**(10): 7281-7288.

Finke, S. and K. K. Conzelmann (2003). "Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly." J Virol **77**(22): 12074-12082.

Finke, S., J. H. Cox and K. K. Conzelmann (2000). "Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene." J Virol **74**(16): 7261-7269.

Finke, S., R. Mueller-Waldeck and K. K. Conzelmann (2003). "Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication." J Gen Virol **84**(Pt 6): 1613-1621.

Fix, J., M. Galloux, M. L. Blondot and J. F. Eleouet (2011). "The insertion of fluorescent proteins in a variable region of respiratory syncytial virus L polymerase results in fluorescent and functional enzymes but with reduced activities." Open Virol J **5**: 103-108.

Flamand, A. and J. F. Delagneau (1978). "Transcriptional mapping of rabies virus in vivo." J Virol **28**(2): 518-523.

Fouquet, B., J. Nikolic, F. Larrous, H. Bourhy, C. Wirblich, C. Lagaudriere-Gesbert and D. Blondel (2015). "Focal adhesion kinase is involved in rabies virus infection through its interaction with viral phosphoprotein P." J Virol **89**(3): 1640-1651.

Fu, Z. F., E. Weihe, Y. M. Zheng, M. K. Schafer, H. Sheng, S. Corisdeo, F. J. Rauscher, 3rd, H. Koprowski and B. Dietzschold (1993). "Differential effects of rabies and borna disease viruses on immediate-early- and late-response gene expression in brain tissues." J Virol **67**(11): 6674-6681.

Furic, L., M. Maher-Laporte and L. DesGroseillers (2008). "A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes." RNA **14**(2): 324-335.

Galloway, S. E. and G. W. Wertz (2008). "S-adenosyl homocysteine-induced hyperpolyadenylation of vesicular stomatitis virus mRNA requires the methyltransferase activity of L protein." J Virol **82**(24): 12280-12290.

Gao, Y., N. J. Greenfield, D. Z. Cleverley and J. Lenard (1996). "The transcriptional form of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is a trimer: structure and stability." Biochemistry **35**(46): 14569-14573.

Garoff, H., R. Hewson and D. J. Opstelten (1998). "Virus maturation by budding." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1171-1190.

Gaudier, M., Y. Gaudin and M. Knossow (2002). "Crystal structure of vesicular stomatitis virus matrix protein." EMBO J **21**(12): 2886-2892.

Gaudin, Y. (2000). "Reversibility in fusion protein conformational changes. The intriguing case of rhabdovirus-induced membrane fusion." *Subcell Biochem* **34**: 379-408.

Gaudin, Y., R. W. Ruigrok, M. Knossow and A. Flamand (1993). "Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion." *J Virol* **67**(3): 1365-1372.

Gaudin, Y., R. W. Ruigrok, C. Tuffereau, M. Knossow and A. Flamand (1992). "Rabies virus glycoprotein is a trimer." *Virology* **187**(2): 627-632.

Gaudin, Y., C. Tuffereau, D. Segretain, M. Knossow and A. Flamand (1991). "Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein." *J Virol* **65**(9): 4853-4859.

Gautrey, H., J. McConnell, M. Lako, J. Hall and J. Hesketh (2008). "Staufen1 is expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic stem cell differentiation." *Biochim Biophys Acta* **1783**(10): 1935-1942.

Gavis, E. R. (1997). "Expeditions to the pole: RNA localization in *Xenopus* and *Drosophila*." *Trends Cell Biol* **7**(12): 485-492.

Gholami, A., R. Kassis, E. Real, O. Delmas, S. Guadagnini, F. Larrous, D. Obach, M. C. Prevost, Y. Jacob and H. Bourhy (2008). "Mitochondrial dysfunction in lyssavirus-induced apoptosis." *J Virol* **82**(10): 4774-4784.

Gibbons, R. V. (2002). "Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission." *Ann Emerg Med* **39**(5): 528-536.

Gluska, S., E. E. Zahavi, M. Chein, T. Gradus, A. Bauer, S. Finke and E. Perlson (2014). "Rabies Virus Hijacks and accelerates the p75NTR retrograde axonal transport machinery." *PLoS Pathog* **10**(8): e1004348.

Goetze, B., F. Tuebing, Y. Xie, M. M. Dorostkar, S. Thomas, U. Pehl, S. Boehm, P. Macchi and M. A. Kiebler (2006). "The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis." *J Cell Biol* **172**(2): 221-231.

Gong, C., Y. K. Kim, C. F. Woeller, Y. Tang and L. E. Maquat (2009). "SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs." *Genes Dev* **23**(1): 54-66.

Gong, C. and L. E. Maquat (2011). "lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements." *Nature* **470**(7333): 284-288.

Green, T. J., X. Zhang, G. W. Wertz and M. Luo (2006). "Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex." *Science* **313**(5785): 357-360.

Gupta, A. K., D. Blondel, S. Choudhary and A. K. Banerjee (2000). "The phosphoprotein of rabies virus is phosphorylated by a unique cellular protein kinase and specific isomers of protein kinase C." *J Virol* **74**(1): 91-98.

Hale, B. G., R. E. Randall, J. Ortin and D. Jackson (2008). "The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses." *J Gen Virol* **89**(Pt 10): 2359-2376.

Hampson, K., L. Coudeville, T. Lembo, M. Sambo, A. Kieffer, M. Atlan, J. Barrat, J. D. Blanton, D. J. Briggs, S. Cleaveland, P. Costa, C. M. Freuling, E. Hiby, L. Knopf, F. Leanes, F. X. Meslin, A. Metlin, M. E. Miranda, T. Muller, L. H. Nel, S. Recuenco, C. E. Rupprecht, C. Schumacher, L. Taylor, M. A. Vigilato, J. Zinsstag, J. Dushoff and P. Global Alliance for Rabies Control Partners for Rabies (2015). "Estimating the global burden of endemic canine rabies." *PLoS Negl Trop Dis* **9**(4): e0003709.

Hampson, K., J. Dushoff, S. Cleaveland, D. T. Haydon, M. Kaare, C. Packer and A. Dobson (2009). "Transmission dynamics and prospects for the elimination of canine rabies." *PLoS Biol* **7**(3): e53.

Harty, R. N., A. P. Schmitt, F. Bouamr, C. B. Lopez and C. Krummenacher (2011). "Virus budding/host interactions." Adv Virol **2011**: 963192.

Heraud-Farlow, J. E., T. Sharangdhar, X. Li, P. Pfeifer, S. Tauber, D. Orozco, A. Hormann, S. Thomas, A. Bakosova, A. R. Farlow, D. Edbauer, H. D. Lipshitz, Q. D. Morris, M. Bilban, M. Doyle and M. A. Kiebler (2013). "Staufen2 regulates neuronal target RNAs." Cell Rep **5**(6): 1511-1518.

Hsu, A. C. (2018). "Influenza Virus: A Master Tactician in Innate Immune Evasion and Novel Therapeutic Interventions." Front Immunol **9**: 743.

Iseni, F., A. Barge, F. Baudin, D. Blondel and R. W. Ruigrok (1998). "Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures." J Gen Virol **79 (Pt 12)**: 2909-2919.

Ito, Y., N. Ito, S. Saito, T. Masatani, K. Nakagawa, Y. Atoji and M. Sugiyama (2010). "Amino acid substitutions at positions 242, 255 and 268 in rabies virus glycoprotein affect spread of viral infection." Microbiol Immunol **54**(2): 89-97.

Ivanov, I., T. Crepin, M. Jamin and R. W. Ruigrok (2010). "Structure of the dimerization domain of the rabies virus phosphoprotein." J Virol **84**(7): 3707-3710.

Jacob, Y., H. Badrane, P. E. Ceccaldi and N. Tordo (2000). "Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein." J Virol **74**(21): 10217-10222.

Jacob, Y., E. Real and N. Tordo (2001). "Functional interaction map of lyssavirus phosphoprotein: identification of the minimal transcription domains." J Virol **75**(20): 9613-9622.

Jayakar, H. R., E. Jeetendra and M. A. Whitt (2004). "Rhabdovirus assembly and budding." Virus Res **106**(2): 117-132.

Jayakar, H. R. and M. A. Whitt (2002). "Identification of two additional translation products from the matrix (M) gene that contribute to vesicular stomatitis virus cytopathology." J Virol **76**(16): 8011-8018.

Kassis, R., F. Larrous, J. Estaquier and H. Bourhy (2004). "Lyssavirus matrix protein induces apoptosis by a TRAIL-dependent mechanism involving caspase-8 activation." J Virol **78**(12): 6543-6555.

Kedersha, N. and P. Anderson (2002). "Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 963-969.

Kedersha, N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller and P. Anderson (1999). "RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules." J Cell Biol **147**(7): 1431-1442.

Kharrat, A., M. J. Macias, T. J. Gibson, M. Nilges and A. Pastore (1995). "Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III." EMBO J **14**(14): 3572-3584.

Kiebler, M. A. and G. J. Bassell (2006). "Neuronal RNA granules: movers and makers." Neuron **51**(6): 685-690.

Kiebler, M. A. and L. DesGroseillers (2000). "Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system." Neuron **25**(1): 19-28.

Kiebler, M. A., I. Hemraj, P. Verkade, M. Kohrmann, P. Fortes, R. M. Marion, J. Ortin and C. G. Dotti (1999). "The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport." J Neurosci **19**(1): 288-297.

Kim, P. K., S. J. Keum, M. O. V. Osinubi, R. Franka, J. Y. Shin, S. T. Park, M. S. Kim, M. J. Park, S. Y. Lee, W. Carson, L. Greenberg, P. Yu, X. Tao, W. Lihua, Q. Tang, G. Liang, M. Shampur, C. E. Rupprecht and S. J. Chang (2017). "Development and characterization of

novel chimeric monoclonal antibodies for broad spectrum neutralization of rabies virus." PLoS One **12**(10): e0186380.

Kim, Y. K., L. Furic, L. Desgroseillers and L. E. Maquat (2005). "Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay." Cell **120**(2): 195-208.

Kim, Y. K., L. Furic, M. Parisien, F. Major, L. DesGroseillers and L. E. Maquat (2007). "Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts." EMBO J **26**(11): 2670-2681.

Klingen, Y., K. K. Conzelmann and S. Finke (2008). "Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport." J Virol **82**(1): 237-245.

Kohrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C. G. Dotti and M. A. Kiebler (1999). "Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons." Mol Biol Cell **10**(9): 2945-2953.

Komarova, A. V., E. Real, A. M. Borman, M. Brocard, P. England, N. Tordo, J. W. Hershey, K. M. Kean and Y. Jacob (2007). "Rabies virus matrix protein interplay with eIF3, new insights into rabies virus pathogenesis." Nucleic Acids Res **35**(5): 1522-1532.

Kouznetzoff, A., M. Buckle and N. Tordo (1998). "Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA." J Gen Virol **79** (Pt 5): 1005-1013.

Lafon, M. (2005). "Rabies virus receptors." J Neurovirol **11**(1): 82-87.

Lahaye, X., A. Vidy, B. Fouquet and D. Blondel (2012). "Hsp70 protein positively regulates rabies virus infection." J Virol **86**(9): 4743-4751.

Lahaye, X., A. Vidy, C. Pomier, L. Obiang, F. Harper, Y. Gaudin and D. Blondel (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**(16): 7948-7958.

Lay, S., C. Prehaud, B. Dietzschold and M. Lafon (2003). "Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a major inducer of apoptosis in human jurkat T cells." Ann N Y Acad Sci **1010**: 577-581.

Le, S., R. Sternglanz and C. W. Greider (2000). "Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA." Mol Biol Cell **11**(3): 999-1010.

Lebeau, G., M. Maher-Laporte, L. Topolnik, C. E. Laurent, W. Sossin, L. Desgroseillers and J. C. Lacaille (2008). "Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells." Mol Cell Biol **28**(9): 2896-2907.

Lebeau, G., L. C. Miller, M. Tartas, R. McAdam, I. Laplante, F. Badeaux, L. DesGroseillers, W. S. Sossin and J. C. Lacaille (2011). "Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons." Learn Mem **18**(5): 314-326.

Lee, A. S., R. Burdeinick-Kerr and S. P. Whelan (2013). "A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(1): 324-329.

LeGendre, J. B., Z. T. Campbell, P. Kroll-Conner, P. Anderson, J. Kimble and M. Wickens (2013). "RNA targets and specificity of Staufen, a double-stranded RNA-binding protein in *Caenorhabditis elegans*." J Biol Chem **288**(4): 2532-2545.

- Lehmann, R. and C. Nusslein-Volhard (1991). "The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo." Development **112**(3): 679-691.
- Lentz, T. L., T. G. Burrage, A. L. Smith, J. Crick and G. H. Tignor (1982). "Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?" Science **215**(4529): 182-184.
- Lentz, T. L., T. G. Burrage, A. L. Smith and G. H. Tignor (1983). "The acetylcholine receptor as a cellular receptor for rabies virus." Yale J Biol Med **56**(4): 315-322.
- Li, J., E. C. Fontaine-Rodriguez and S. P. Whelan (2005). "Amino acid residues within conserved domain VI of the vesicular stomatitis virus large polymerase protein essential for mRNA cap methyltransferase activity." J Virol **79**(21): 13373-13384.
- Li, J., A. Rahmeh, V. Brusica and S. P. Whelan (2009). "Opposing effects of inhibiting cap addition and cap methylation on polyadenylation during vesicular stomatitis virus mRNA synthesis." J Virol **83**(4): 1930-1940.
- Li, J., A. Rahmeh, M. Morelli and S. P. Whelan (2008). "A conserved motif in region v of the large polymerase proteins of nonsegmented negative-sense RNA viruses that is essential for mRNA capping." J Virol **82**(2): 775-784.
- Liang, B., Z. Li, S. Jenni, A. A. Rahmeh, B. M. Morin, T. Grant, N. Grigorieff, S. C. Harrison and S. P. Whelan (2015). "Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy." Cell **162**(2): 314-327.
- Lloyd, R. E. (2012). "How do viruses interact with stress-associated RNA granules?" PLoS Pathog **8**(6): e1002741.
- Luo, M., T. F. Duchaine and L. DesGroseillers (2002). "Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association." Biochem J **365**(Pt 3): 817-824.
- Macdonald, P. M. and K. Kerr (1997). "Redundant RNA recognition events in bicoid mRNA localization." RNA **3**(12): 1413-1420.
- Macdonald, P. M., K. Kerr, J. L. Smith and A. Leask (1993). "RNA regulatory element BLE1 directs the early steps of bicoid mRNA localization." Development **118**(4): 1233-1243.
- Macdonald, P. M. and G. Struhl (1988). "cis-acting sequences responsible for anterior localization of bicoid mRNA in *Drosophila* embryos." Nature **336**(6199): 595-598.
- Marion, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti and J. Ortin (1999). "A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum." Mol Cell Biol **19**(3): 2212-2219.
- Martel, C., P. Macchi, L. Furic, M. A. Kiebler and L. Desgroseillers (2006). "Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants." Biochem J **393**(Pt 1): 245-254.
- Matsumoto, S. (1962). "Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus." Virology **17**: 198-202.
- Mavrakis, M., F. Iseni, C. Mazza, G. Schoehn, C. Ebel, M. Gentzel, T. Franz and R. W. Ruigrok (2003). "Isolation and characterisation of the rabies virus N degrees-P complex produced in insect cells." Virology **305**(2): 406-414.
- Mavrakis, M., A. A. McCarthy, S. Roche, D. Blondel and R. W. Ruigrok (2004). "Structure and function of the C-terminal domain of the polymerase cofactor of rabies virus." J Mol Biol **343**(4): 819-831.

- Mavrakis, M., S. Mehoulas, E. Real, F. Iseni, D. Blondel, N. Tordo and R. W. Ruigrok (2006). "Rabies virus chaperone: identification of the phosphoprotein peptide that keeps nucleoprotein soluble and free from non-specific RNA." *Virology* **349**(2): 422-429.
- 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**(23): 11496-11502.
- Mebatsion, T., M. Konig and K. K. Conzelmann (1996). "Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein." *Cell* **84**(6): 941-951.
- Mebatsion, T., F. Weiland and K. K. Conzelmann (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**(1): 242-250.
- Mellon, M. G. and S. U. Emerson (1978). "Rebinding of transcriptase components (L and NS proteins) to the nucleocapsid template of vesicular stomatitis virus." *J Virol* **27**(3): 560-567.
- Micklem, D. R., J. Adams, S. Grunert and D. St Johnston (2000). "Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation." *EMBO J* **19**(6): 1366-1377.
- Miki, T., K. Takano and Y. Yoneda (2005). "The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function." *Cell Struct Funct* **30**(2): 51-56.
- Milev, M. P., C. M. Brown and A. J. Mouland (2010). "Live cell visualization of the interactions between HIV-1 Gag and the cellular RNA-binding protein Staufen1." *Retrovirology* **7**: 41.
- Mills, J. C., N. Andersson, C. V. Hong, T. S. Stappenbeck and J. I. Gordon (2002). "Molecular characterization of mouse gastric epithelial progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14819-14824.
- Mire, C. E., D. Dube, S. E. Delos, J. M. White and M. A. Whitt (2009). "Glycoprotein-dependent acidification of vesicular stomatitis virus enhances release of matrix protein." *J Virol* **83**(23): 12139-12150.
- Mire, C. E., J. M. White and M. A. Whitt (2010). "A spatio-temporal analysis of matrix protein and nucleocapsid trafficking during vesicular stomatitis virus uncoating." *PLoS Pathog* **6**(7): e1000994.
- Monshausen, M., U. Putz, M. Rehbein, M. Schweizer, L. DesGroseillers, D. Kuhl, D. Richter and S. Kindler (2001). "Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA." *J Neurochem* **76**(1): 155-165.
- Morin, B., A. A. Rahmeh and S. P. Whelan (2012). "Mechanism of RNA synthesis initiation by the vesicular stomatitis virus polymerase." *EMBO J* **31**(5): 1320-1329.
- Moseley, G. W., R. P. Filmer, M. A. DeJesus and D. A. Jans (2007). "Nucleocytoplasmic distribution of rabies virus P-protein is regulated by phosphorylation adjacent to C-terminal nuclear import and export signals." *Biochemistry* **46**(43): 12053-12061.
- Mouland, A. J., J. Mercier, M. Luo, L. Bernier, L. DesGroseillers and E. A. Cohen (2000). "The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation." *J Virol* **74**(12): 5441-5451.
- Murphy, F. A. and S. P. Bauer (1974). "Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system." *Intervirology* **3**(4): 256-268.

Neubauer, J., M. Ogino, T. J. Green and T. Ogino (2016). "Signature motifs of GDP polyribonucleotidyltransferase, a non-segmented negative strand RNA viral mRNA capping enzyme, domain in the L protein are required for covalent enzyme-pRNA intermediate formation." Nucleic Acids Res **44**(1): 330-341.

Newcomb, W. W. and J. C. Brown (1981). "Role of the vesicular stomatitis virus matrix protein in maintaining the viral nucleocapsid in the condensed form found in native virions." J Virol **39**(1): 295-299.

Nieuwburg, R., D. Nashchekin, M. Jakobs, A. P. Carter, P. Khuc Trong, R. E. Goldstein and D. St Johnston (2017). "Localised dynactin protects growing microtubules to deliver oskar mRNA to the posterior cortex of the *Drosophila* oocyte." Elife **6**.

Nikolic, J., A. Civas, Z. Lama, C. Lagaudriere-Gesbert and D. Blondel (2016). "Rabies Virus Infection Induces the Formation of Stress Granules Closely Connected to the Viral Factories." PLoS Pathog **12**(10): e1005942.

Nikolic, J., R. Le Bars, Z. Lama, N. Scrima, C. Lagaudriere-Gesbert, Y. Gaudin and D. Blondel (2017). "Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles." Nat Commun **8**(1): 58.

Ogino, M., N. Ito, M. Sugiyama and T. Ogino (2016). "The Rabies Virus L Protein Catalyzes mRNA Capping with GDP Polyribonucleotidyltransferase Activity." Viruses **8**(5).

Ogino, T. and A. K. Banerjee (2007). "Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus." Mol Cell **25**(1): 85-97.

Ogino, T. and A. K. Banerjee (2010). "The HR motif in the RNA-dependent RNA polymerase L protein of Chandipura virus is required for unconventional mRNA-capping activity." J Gen Virol **91**(Pt 5): 1311-1314.

Ogino, T., M. Kobayashi, M. Iwama and K. Mizumoto (2005). "Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA." J Biol Chem **280**(6): 4429-4435.

Oksayan, S., J. Nikolic, C. T. David, D. Blondel, D. A. Jans and G. W. Moseley (2015). "Identification of a role for nucleolin in rabies virus infection." J Virol **89**(3): 1939-1943.

Oksayan, S., L. Wiltzer, C. L. Rowe, D. Blondel, D. A. Jans and G. W. Moseley (2012). "A novel nuclear trafficking module regulates the nucleocytoplasmic localization of the rabies virus interferon antagonist, P protein." J Biol Chem **287**(33): 28112-28121.

Park, E. and L. E. Maquat (2013). "Staufen-mediated mRNA decay." Wiley Interdiscip Rev RNA **4**(4): 423-435.

Pasdeloup, D., N. Poisson, H. Raux, Y. Gaudin, R. W. Ruigrok and D. Blondel (2005). "Nucleocytoplasmic shuttling of the rabies virus P protein requires a nuclear localization signal and a CRM1-dependent nuclear export signal." Virology **334**(2): 284-293.

Pattnaik, A. K., L. Hwang, T. Li, N. Englund, M. Mathur, T. Das and A. K. Banerjee (1997). "Phosphorylation within the amino-terminal acidic domain I of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is required for transcription but not for replication." J Virol **71**(11): 8167-8175.

Poch, O., B. M. Blumberg, L. Bougueleret and N. Tordo (1990). "Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains." J Gen Virol **71** (Pt 5): 1153-1162.

Prehaud, C., S. Lay, B. Dietzschold and M. Lafon (2003). "Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis." J Virol **77**(19): 10537-10547.

Rahmeh, A. A., A. D. Schenk, E. I. Danek, P. J. Kranzusch, B. Liang, T. Walz and S. P. Whelan (2010). "Molecular architecture of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(46): 20075-20080.

Ramasamy, S., H. Wang, H. N. Quach and K. Sampath (2006). "Zebrafish Staufen1 and Staufen2 are required for the survival and migration of primordial germ cells." Dev Biol **292**(2): 393-406.

Raux, H., A. Flamand and D. Blondel (2000). "Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain." J Virol **74**(21): 10212-10216.

Ricci, E. P., A. Kucukural, C. Cenik, B. C. Mercier, G. Singh, E. E. Heyer, A. Ashar-Patel, L. Peng and M. J. Moore (2014). "Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation." Nat Struct Mol Biol **21**(1): 26-35.

Roche, S. and Y. Gaudin (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., F. A. Rey, Y. Gaudin and S. Bressanelli (2007). "Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G." Science **315**(5813): 843-848.

Rowe, C. L., K. M. Wagstaff, S. Oksayan, D. J. Glover, D. A. Jans and G. W. Moseley (2016). "Nuclear Trafficking of the Rabies Virus Interferon Antagonist P-Protein Is Regulated by an Importin-Binding Nuclear Localization Sequence in the C-Terminal Domain." PLoS One **11**(3): e0150477.

Ruedas, J. B. and J. Perrault (2009). "Insertion of enhanced green fluorescent protein in a hinge region of vesicular stomatitis virus L polymerase protein creates a temperature-sensitive virus that displays no virion-associated polymerase activity in vitro." J Virol **83**(23): 12241-12252.

Ruigrok, R. W., T. Crepin and D. Kolakofsky (2011). "Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses." Curr Opin Microbiol **14**(4): 504-510.

Schnapp, B. J. (1999). "A glimpse of the machinery." Curr Biol **9**(19): R725-727.

Schnell, M. J., L. Buonocore, E. Boritz, H. P. Ghosh, R. Chernish and J. K. Rose (1998). "Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus." EMBO J **17**(5): 1289-1296.

Shen, C. P., J. A. Knoblich, Y. M. Chan, M. M. Jiang, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1998). "Miranda as a multidomain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufen and Prospero during asymmetric cell division in Drosophila." Genes Dev **12**(12): 1837-1846.

Singh, G., S. Jakob, M. G. Kleedehn and J. Lykke-Andersen (2007). "Communication with the exon-junction complex and activation of nonsense-mediated decay by human Upf proteins occur in the cytoplasm." Mol Cell **27**(5): 780-792.

Singh, R., K. P. Singh, S. Cherian, M. Saminathan, S. Kapoor, G. B. Manjunatha Reddy, S. Panda and K. Dhama (2017). "Rabies - epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review." Vet Q **37**(1): 212-251.

Sokol, F., D. Stancek and H. Koprowski (1971). "Structural proteins of rabies virus." J Virol **7**(2): 241-249.

Spiropoulou, C. F. and S. T. Nichol (1993). "A small highly basic protein is encoded in overlapping frame within the P gene of vesicular stomatitis virus." *J Virol* **67**(6): 3103-3110.

St Johnston, D., N. H. Brown, J. G. Gall and M. Jantsch (1992). "A conserved double-stranded RNA-binding domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 10979-10983.

St Johnston, D., W. Driever, T. Berleth, S. Richstein and C. Nusslein-Volhard (1989). "Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte." *Development* **107** **Suppl**: 13-19.

Steward, O. (1997). "mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism?" *Neuron* **18**(1): 9-12.

Stillman, E. A. and M. A. Whitt (1999). "Transcript initiation and 5'-end modifications are separable events during vesicular stomatitis virus transcription." *J Virol* **73**(9): 7199-7209.

Sugimoto, Y., A. Vigilante, E. Darbo, A. Zirra, C. Militti, A. D'Ambrogio, N. M. Luscombe and J. Ule (2015). "hiCLIP reveals the in vivo atlas of mRNA secondary structures recognized by Stauf1." *Nature* **519**(7544): 491-494.

Superti, F., M. Derer and H. Tsiang (1984). "Mechanism of rabies virus entry into CER cells." *J Gen Virol* **65** (Pt 4): 781-789.

Superti, F., B. Hauttecoeur, M. J. Morelec, P. Goldoni, B. Bizzini and H. Tsiang (1986). "Involvement of gangliosides in rabies virus infection." *J Gen Virol* **67** (Pt 1): 47-56.

Tan, G. S., M. A. Preuss, J. C. Williams and M. J. Schnell (2007). "The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(17): 7229-7234.

Tang, S. J., D. Meulemans, L. Vazquez, N. Colaco and E. Schuman (2001). "A role for a rat homolog of stauf1 in the transport of RNA to neuronal dendrites." *Neuron* **32**(3): 463-475.

Tawar, R. G., S. Duquerroy, C. Vonrhein, P. F. Varela, L. Damier-Piolle, N. Castagne, K. MacLellan, H. Bedouelle, G. Bricogne, D. Bhella, J. F. Eleouet and F. A. Rey (2009). "Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus." *Science* **326**(5957): 1279-1283.

Taylor, G. M., P. I. Hanson and M. Kielian (2007). "Ubiquitin depletion and dominant-negative VPS4 inhibit rhabdovirus budding without affecting alphavirus budding." *J Virol* **81**(24): 13631-13639.

Taylor, L. H., K. Hampson, A. Fahrion, B. Abela-Ridder and L. H. Nel (2017). "Difficulties in estimating the human burden of canine rabies." *Acta Trop* **165**: 133-140.

Taylor, L. H., L. Knopf and P. Partners for Rabies (2015). "Surveillance of Human Rabies by National Authorities--A Global Survey." *Zoonoses Public Health* **62**(7): 543-552.

Teixeira, D., U. Sheth, M. A. Valencia-Sanchez, M. Brengues and R. Parker (2005). "Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs." *RNA* **11**(4): 371-382.

Tekes, G., A. A. Rahmeh and S. P. Whelan (2011). "A freeze frame view of vesicular stomatitis virus transcription defines a minimal length of RNA for 5' processing." *PLoS Pathog* **7**(6): e1002073.

Thomas, D., W. W. Newcomb, J. C. Brown, J. S. Wall, J. F. Hainfeld, B. L. Trus and A. C. Steven (1985). "Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis." *J Virol* **54**(2): 598-607.

Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, M. A. Desbats, C. C. Leishman and G. L. Boccaccio (2009). "Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly." *J Cell Sci* **122**(Pt 4): 563-573.

Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, M. Loschi, J. M. Pasquini, J. Correale, S. Kindler and G. L. Boccaccio (2005). "Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes." *Mol Biol Cell* **16**(1): 405-420.

Thoulouze, M. I., M. Lafage, M. Schachner, U. Hartmann, H. Cremer and M. Lafon (1998). "The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus." *J Virol* **72**(9): 7181-7190.

Tian, D., Z. Luo, M. Zhou, M. Li, L. Yu, C. Wang, J. Yuan, F. Li, B. Tian, B. Sui, H. Chen, Z. F. Fu and L. Zhao (2016). "Critical Role of K1685 and K1829 in the Large Protein of Rabies Virus in Viral Pathogenicity and Immune Evasion." *J Virol* **90**(1): 232-244.

Tiedge, H., F. E. Bloom and D. Richter (1999). "RNA, whither goest thou?" *Science* **283**(5399): 186-187.

Tordo, N., O. Poch, A. Ermine and G. Keith (1986). "Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV." *Nucleic Acids Res* **14**(6): 2671-2683.

Tordo, N., O. Poch, A. Ermine, G. Keith and F. Rougeon (1986). "Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(11): 3914-3918.

Tordo, N., O. Poch, A. Ermine, G. Keith and F. Rougeon (1988). "Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses." *Virology* **165**(2): 565-576.

Tsiang, H. (1982). "Neuronal function impairment in rabies-infected rat brain." *J Gen Virol* **61** (Pt 2): 277-281.

Tuffereau, C., E. Desmezieres, J. Benejean, C. Jallet, A. Flamand, N. Tordo and P. Perrin (2001). "Interaction of lyssaviruses with the low-affinity nerve-growth factor receptor p75NTR." *J Gen Virol* **82**(Pt 12): 2861-2867.

Tuffereau, C., K. Schmidt, C. Langevin, F. Lafay, G. Dechant and M. Koltzenburg (2007). "The rabies virus glycoprotein receptor p75NTR is not essential for rabies virus infection." *J Virol* **81**(24): 13622-13630.

van der Heijden, R. W., J. P. Langedijk, J. Groen, F. G. UytdeHaag, R. H. Melen and A. D. Osterhaus (1993). "Structural and functional studies on a unique linear neutralizing antigenic site (G5) of the rabies virus glycoprotein." *J Gen Virol* **74** (Pt 8): 1539-1545.

van Dijk, A. A., E. V. Makeyev and D. H. Bamford (2004). "Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization." *J Gen Virol* **85**(Pt 5): 1077-1093.

Vessey, J. P., P. Macchi, J. M. Stein, M. Mikl, K. N. Hawker, P. Vogelsang, K. Wiczorek, G. Vendra, J. Riefler, F. Tubing, S. A. Aparicio, T. Abel and M. A. Kiebler (2008). "A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(42): 16374-16379.

Vidy, A., M. Chelbi-Alix and D. Blondel (2005). "Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways." *J Virol* **79**(22): 14411-14420.

Vidy, A., J. El Bougrini, M. K. Chelbi-Alix and D. Blondel (2007). "The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1." *J Virol* **81**(8): 4255-4263.

Villace, P., R. M. Marion and J. Ortin (2004). "The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs." Nucleic Acids Res **32**(8): 2411-2420.

Wang, C. and R. Lehmann (1991). "Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*." Cell **66**(4): 637-647.

Wang, J., Z. Wang, R. Liu, L. Shuai, X. Wang, J. Luo, C. Wang, W. Chen, X. Wang, J. Ge, X. He, Z. Wen and Z. Bu (2018). "Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus." PLoS Pathog **14**(7): e1007189.

Wang, J. T., L. E. McElvain and S. P. Whelan (2007). "Vesicular stomatitis virus mRNA capping machinery requires specific cis-acting signals in the RNA." J Virol **81**(20): 11499-11506.

Weil, T. T., D. Xanthakis, R. Parton, I. Dobbie, C. Rabouille, E. R. Gavis and I. Davis (2010). "Distinguishing direct from indirect roles for bicoid mRNA localization factors." Development **137**(1): 169-176.

Whelan, S. P. and G. W. Wertz (2002). "Transcription and replication initiate at separate sites on the vesicular stomatitis virus genome." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9178-9183.

Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi and L. DesGroseillers (1999). "Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum." Mol Cell Biol **19**(3): 2220-2230.

Wirblich, C., G. S. Tan, A. Papaneri, P. J. Godlewski, J. M. Orenstein, R. N. Harty and M. J. Schnell (2008). "PPEY motif within the rabies virus (RV) matrix protein is essential for efficient virion release and RV pathogenicity." J Virol **82**(19): 9730-9738.

Wunner, W. H., K. J. Reagan and H. Koprowski (1984). "Characterization of saturable binding sites for rabies virus." J Virol **50**(3): 691-697.

Zan, J., S. T. An, K. K. Mo, J. W. Zhou, J. Liu, H. L. Wang, Y. Yan, M. Liao and J. Y. Zhou (2016). "Rabies virus inactivates cofilin to facilitate viral budding and release." Biochem Biophys Res Commun **477**(4): 1045-1050.

Table illustration

Figure 1 : Planisphère de la répartition géographique des cas de rage humains.....	12
Figure 2 : Schéma explicatif d'une infection rabique et de la propagation du virus dans l'organisme	16
Figure 3 : Schéma de la classification des <i>Mononegavirales</i>	17
Figure 4 : Schéma d'une particule virale rabique	18
Figure 5 : Photo de microscopie électronique de la nucléocapside (N+ARN) du virus de la rage	19
Figure 6 : Représentation schématique du génome du virus de la rage	20
Figure 7 : Cycle répliatif du virus de la rage.	21
Figure 8 : Rôle des récepteurs nAChR (vert), NCAM (violet) et p75 ^{NTR} (bleu) au niveau de la jonction neuromusculaire.	24
Figure 9 : Représentation schématique du transport rétrograde du virus rabique après infection et implication du récepteur p75 ^{NTR}	25
Figure 10 : Représentation schématique du gradient décroissant de l'expression des transcrits rabiques	27
Figure 11 : Représentation de la nucléoprotéine N du virus rabique avec l'ARN (Albertini, Wernimont et al. 2006)	33
Figure 12 : Représentation schématique de la phosphoprotéine rabique	34
Figure 13 : Représentation schématique des cinq isoformes de la protéine P, des signaux d'import et d'export nucléaire, et des sites de liaison avec la NC et la L.	35
Figure 14 : Représentation des domaines d'interaction de la protéine P avec ses partenaires viraux et cellulaires.	38
Figure 15 : La protéine M du virus de la rage.	40
Figure 15 : Représentation des formes pré- et post-fusion de la glycoprotéine de VSV	42
Figure 16 : Représentation schématique de la polymérase (L) du virus de la rage et de ses domaines d'activités.	44
Figure 17 : (A) Représentation d'une coiffe d'ARNm. (B) Représentation du schéma conventionnel pour la pose d'une coiffe	45
Figure 18 : Architecture moléculaire de la polymérase du VSV	46
Figure 19 : Schéma des étapes de méthylation de la coiffe des ARNm des <i>Rhabdoviridae</i>	47
Figure 20 : Représentation schématique du principe du double hybride	51
Figure 21 : Schéma de l'œuf de drosophile composé de quinze cellules nourricières et d'une cellule oocyte.	53
Figure 22 : Schéma de la protéine chez la drosophile (dmStau) et de ses homologues mammaliens.	55
Figure 23 : Modèle de la structure secondaire de la région 3'UTR de l'ARNm Bicoïd.....	57
Figure 24 : Modèle compétitif entre les mécanismes SMD et NMD	61
Figure 25 : Représentation des deux mécanismes de reconnaissance des SBS par la protéine Staufen 1	62
Figure 26 : Schéma de l'assemblage des Granules de Stress et des P-Bodies.	64
Figure 27 : HIV-1 et la protéine hStaufen 1.	66
Figure 28 : Rôle de la protéine NS1 dans le cycle répliatif du virus Influenza et détournement de la protéine hStaufen 1.	67
Figure 29 : Analyse du crible en double hybride de la polymérase du virus de la rage contre une banque d'ADNc humaine.	71
Figure 30 : Etapes de clonage par le technique gateway	76
Figure 31 : Représentation schématique de la cassette shRNA avant insertion	78

Figure 32 : Représentation des séquences codantes l'EGFP et le shRNA après intégration dans le plasmide pTrip-GFP	79
Figure 33 : Représentation schématique des trois plasmides nécessaires pour la production des vecteurs lentiviraux portant les shARNs.	80
Figure 34 : Représentation d'un vecteur lentiviral et de ses composants	81
Figure 35 : La protéine hStaufen 1 est un partenaire de la polymérase rabique.	93
Figure 36 : Colocalisation de la protéine hStaufen 1 et de la GFP-L en cellule SK-N-SH.	94
Figure 37 : Réorganisation de la protéine hStaufen 1 à la suite d'une infection rabique.	96
Figure 38 : Détection de la protéine hStaufen 1 après infection par les virus SAD et CVS des cellules HEK293T et SK-N-SH.	97
Figure 39 : Les granules de hStaufen 1 sont présent autour des corps de Negri et ont un mouvement satellitaire autour de ces structures.	99
Figure 40 : Cytotoxicité de la transduction des vecteurs lentiviraux contrôles et hStaufen1 en cellules 293T et SK-N-SH.	101
Figure 41 : Pourcentage de transduction des vecteurs contrôles et hStaufen 1 sur cellules HEK293T.	102
Figure 42 : Détermination de l'efficacité de diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 par les constructions Stau 46 et 48.....	102
Figure 43 : Caractérisation par immunofluorescence de la diminution d'expression de hStaufen 1 en cellules HEK293T et SK-N-SH.	103
Figure 44 : La diminution d'expression de hStaufen 1 n'impacte pas la susceptibilité des cellules HEK293T ou SK-N-SH à l'infection par le virus de la rage.	105
Figure 45 : La diminution d'expression de hStaufen 1 conduit à l'augmentation de la quantité de protéines virales intracellulaires.	106
Figure 46 : Quantification des RNPs intracellulaires après diminution d'expression de hStaufen 1 par Elisa	107
Figure 47 : La diminution d'expression de hStaufen 1 bloque la formation des corps de Negri secondaires et la dissémination intracellulaire des RNPs	108
Figure 48 : La diminution d'expression de la protéine hStaufen 1 n'impact pas les activités de transcription et de réplication de la polymérase rabique	110
Figure 49 : Le surnageant des cellules diminuées en leur expression de hStaufen 1 est moins infectieux	111
Figure 50 : Quantification de l'ARN génomique et anti-génomique relargués dans le surnageant de cellules HEK293T et SK-N-SH hStaufen 1 ⁻	113
Figure 51 : La protéine hStaufen 1 est encapsidée dans le virion rabique	115
Figure 52 : Les protéines hStaufen 1 et G3BP ont un localisation cytoplasmique mais ne colocalisent pas	117
Figure 53 : La diminution d'expression de hStaufen 1 n'induit pas la formation de granules de stress	118
Figure 54 : L'infection rabique induit la formation de granules de stress dans lesquels la protéine hStaufen 1 est recrutée	119
Figure 55 : La diminution d'expression de hStaufen 1 influence la formation des granules de stress viraux induits de façon différente selon le type cellulaire	120
Figure 56 : la protéine hStaufen 1 n'est pas une protéine associée aux microtubules	122
Figure 57 : Gamme de détection par Western Blot des protéines kinésine et hStaufen 1	123
Figure 58 : La protéine hStaufen 1 est présente dans les prolongements neurax des cellules SK-N-SH D	124
Figure 59 : La protéine hStaufen se condense autour des RNPs transitant le long des neurites	127

Figure 60 : Rôle de la protéine hStaufen 1 dans le cycle réplcatif du virus de la rage.....	136
Figure 61 : (A) Interaction en double hybride des protéines TGF1I1, hnRNPH2 et eEF1A1 avec la polymérase de la souche PV du virus de la rage et ses fragments Nter et Cter ainsi qu'avec les protéines N et P.....	140
Figure 62 : Observation de la protéine eEF1A1 dans les cellules HEK293T et SK-N-SH non infectées (A) et après infection par virus de la rage (B)	141
Figure 63 : Observation de la protéine TGFβ1I1 dans les cellules HEK293T et SK-N-SH non infectées (A) et après infection par virus de la rage (B)	143
Figure 64 : Effet de la diminution d'expression de la protéine eEF1A1 des cellules HEK293T et SK-N-SH sur les protéines rabiques intracellulaires.	144
Figure 65 : Effet de la diminution d'expression de la protéine hnRNPH2 des cellules HEK293T et SK-N-SH sur les protéines rabiques intracellulaires.	145
Figure 66 : Effet de la diminution d'expression de la protéine eEF1A1 sur l'établissement des Corps de Negri	146
Figure 67 : La diminution d'expression des protéines eEF1A1 et TGFβ1I1 n'impacte pas les activités de transcription et de réplcation de la polymérase rabique	147
Figure 68 : Effet de la diminution d'expression des protéines eEF1A1 et hnRNPH2 sur la production des particules virales	149

Table tableau

Tableau 1 : Séquences des siRNA testées contre les partenaires de la polymérase sélectionnés.	72
Tableau 2 : Oligonucléotides utilisés pour le clonage des partenaires de la polymérase selon la méthode « <i>gateway</i> ».	73
Tableau 3 : Oligonucléotides utilisés pour la RT-QPCR afin de quantifier l'ARN viral génomique et anti-génomique	82
Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés	88
Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires utilisés	89
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les protéines eEF1A1, hnRNPH2 et TGFβ111	150

Rôle fonctionnel de protéines cellulaires interagissant avec la polymérase du virus de la rage

La transcription et la réplication du virus de la rage sont réalisées par sa polymérase (L), une ARN polymérase ARN dépendante, au sein d'inclusions cellulaires viro-induites : les corps de Negri (CN). Durant les premières étapes de l'infection, on observe un ou deux CNs par cellule (CN primaire) qui grossissent et donnent naissance à plusieurs autres CNs de taille inférieure (CN secondaire). Les CNs concentrent l'ensemble des protéines virales et cellulaires nécessaires à la réplication virale. Bien que certains mécanismes de régulation entre protéines virales impliquées soient décrits, la nature et le rôle des partenaires cellulaires demeurent largement inconnus. Un crible en double hybride en levure d'une banque d'ADNc humain a permis l'identification de partenaires cellulaires de la L rabique, notamment de la protéine hStaufen 1. La cartographie de l'interaction montre que les extrémités Cterminales des deux protéines sont requises. Lors d'une infection par le virus de la rage la protéine hStaufen 1, présente uniformément dans le cytoplasme, est réorganisée en structures granulaires à proximité des CNs autour desquels elle gravite avec des mouvements de rapprochement, d'éloignement et des contacts furtifs. Cette dynamique de la protéine hStaufen 1 pourrait être liée à son rôle intermédiaire entre les CNs et les granules de stress induits par l'infection rabique. La déplétion partielle de hStaufen 1 dans la cellule conduit à l'augmentation intracellulaire des protéines virales, à l'inhibition de la formation des CNs secondaires et à la diminution du bourgeonnement et de la libération des particules virales dans le milieu extracellulaire. Ceci indique que la protéine hStaufen 1 joue un rôle majeur dans le transport intracellulaire microtubule dépendant des ribonucléocapsides néo-synthétisées vers leur site de bourgeonnement. Trois autres partenaires de la protéine L issus du crible en double hybride ont aussi été étudiés : eEF1A1 (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*) ; hnRNPH2 (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein*) ; TGFβ1I1 (*Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein*). Des résultats préliminaires suggèrent leur implication dans le cycle réplcatif du virus de la rage depuis la régulation de la transcription et de la réplication rabiques au sein des CNs jusqu'au relargage des virions.

Mots clés : virus de la rage, polymérase L, hStaufen 1, corps de Negri

Functional role of cellular partners of the rabies virus polymerase

The transcription and replication of the rabies virus are performed by the polymerase (L), an RNA dependant RNA polymerase, in cellular inclusions induced by the virus: the Negri Bodies (NB). During early infection, there is only one or two NB per cell (primary NB), growing with time up to their dispersion in several smaller NB (secondary NB). The NB concentrates all viral and cellular proteins necessary for the viral replication. Although several regulatory mechanisms between involved viral proteins are well described, the nature and role of cellular partners remain largely unknown. A yeast two-hybrid screening of a human cDNA library has identified cellular partners of the rabies L protein, in particular the hStaufen 1 protein. A mapping of the interaction showed that the Cterminal part of both proteins are required. During rabies infection, hStaufen 1, uniformly present in the cytoplasm, is reorganized in granular structures close to the NB, including back and forth movements with furtive contacts. This dynamics of hStaufen 1 is evocative of an intermediate role between NB and stress granules (SG) induced by rabies virus infection. Knock down of hStaufen 1 in the cell leads to increased amounts of intracellular viral proteins, to the inhibition of secondary NB formation and to a decrease of the budding and virion release from cell. This indicates that hStaufen 1 plays a major role in the microtubule-dependent intracellular transport of the newly synthesized ribonucleocapsids up to the site of budding. Three other L protein partners discovered during the two-hybrid screening have also been studied: eEF1A1 (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*); hnRNPH2 (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein*) ; TGFβ1I1 (*Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein*). Preliminary results suggest that they are somehow involved in the rabies virus replicative cycle, from transcription/replication inside NB to rabies virus release in the external environment.

Keywords: rabies virus, L polymerase, hStaufen 1, Negri Bodies