



**HAL**  
open science

# Etude fonctionnelle et structurale de la glycoprotéine du virus de la Stomatite Vésiculaire et des Lyssavirus

Marie Minoves

## ► To cite this version:

Marie Minoves. Etude fonctionnelle et structurale de la glycoprotéine du virus de la Stomatite Vésiculaire et des Lyssavirus. Virologie. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASL068 . tel-04828821

**HAL Id: tel-04828821**

**<https://theses.hal.science/tel-04828821v1>**

Submitted on 10 Dec 2024

**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.

# Étude fonctionnelle et structurale de la glycoprotéine du virus de la Stomatite Vésiculaire et des Lyssavirus

*Structural and functional basis of the Glycoprotein of Stomatitis  
Vesicular Virus and Lyssaviruses*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577 :

Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Biochimie et biologie structurale

Graduate School : Life Sciences and Health.

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'**Institut de biologie Intégrative de la cellule (I2BC) (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS)**, sous la direction de **Yves GAUDIN**, Directeur de recherche, et le co-encadrement de **Aurélié ALBERTINI**, Directrice de recherche.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 14 Octobre 2024, par

**Marie MINOVES**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

**Sylvie NESSLER**

Professeur des Universités, Université Paris-Saclay

Présidente

**Isabelle IMBERT**

Professeur des Universités, Aix Marseille Université

Rapportrice et Examinatrice

**Patrice GOUET**

Professeur des Universités, Lyon-1

Rapporteur et Examineur

**Bernard DELMAS**

Directeur de recherche, Université Paris-Saclay

Examineur

**Titre :** Étude fonctionnelle et structurale de la glycoprotéine du virus de la Stomatite Vésiculaire et des Lyssavirus

**Mots clés :** Glycoprotéines de fusion virales, Entrée virale, Fusion membranaire, Virologie structurale, Rhabdovirus

**Résumé :** Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est un virus enveloppé appartenant au genre *Vésiculovirus* et à la famille des *Rhabdoviridae*. Son unique glycoprotéine G reconnaît un récepteur à la surface de la cellule hôte puis, après endocytose du virion, déclenche la fusion membranaire grâce à une transition structurale induite à faible pH depuis la forme pré-fusion de G vers sa forme post-fusion. Par ailleurs, G est la cible des anticorps neutralisant le virus.

Les structures cristallographiques des formes pré- et post-fusion de l'ectodomaine soluble de G (i.e. sans sa partie transmembranaire) ont été déterminées par radiocristallographie. Ces structures ont installé G comme étant le prototype des glycoprotéines de fusion de classe III. L'organisation de l'extrémité carboxyterminale de l'ectodomaine et du domaine transmembranaire de G, qui jouent un rôle important durant le processus de fusion, n'est cependant pas connue. Nous avons donc réalisé une étude par cryo-microscopie électronique sur la glycoprotéine complète, purifiée à partir de particules virales, seule ou en complexe avec un anticorps monoclonal. Cette étude nous a permis de compléter les structures de l'ectodomaine dans ses conformations pré et post-fusion. Elle révèle aussi que les domaines transmembranaires sont mobiles au sein de la membrane.

Par ailleurs, nous avons résolu deux structures de G en complexe avec un FAb dérivé d'un anticorps neutralisant, reconnaissant à la fois les formes pré- et post-fusion de plusieurs souches de *Vésiculovirus*.

Cette première structure d'un complexe entre G et un anticorps nous a permis de caractériser finement l'épitope, d'identifier les résidus de G clefs dans l'interaction et de proposer un mécanisme de neutralisation. Ce travail augmente de façon significative nos connaissances sur la structure de G qui est la glycoprotéine la plus utilisée en biotechnologie pour délivrer un cargo et en thérapie génique (par pseudotypage de lentivirus).

Nous avons également débuté une étude visant à caractériser les glycoprotéines des Lyssavirus, genre appartenant également à la famille des *Rhabdoviridae*, et dont le virus de la rage est le prototype. Nous avons produit et purifié les ectodomains de plusieurs Lyssavirus, et nous avons pu obtenir une structure cristallographique de l'ectodomaine du virus Ikoma qui correspondrait à un intermédiaire monomérique tardif. Afin de poursuivre le travail de caractérisation de cette structure, plusieurs approches sont en cours. Nous avons notamment réalisé une sélection par phage display de ligands alphaReps dirigés contre Ikoma G en collaboration avec l'équipe de Philippe Minard et Agathe Urvoas à l'12BC. Les alphareps sont des protéines artificielles constituées par des répétitions hélicoïdales. Les alphareps sélectionnées contre Ikoma G sont en cours de caractérisation. Ces outils peuvent nous servir d'aide à la cristallographie en piégeant des conformations différentes de G que celle obtenues. Elles nous serviront également d'outils pour les aspects de biologie cellulaire.

**Title:** Structural and functional basis of the Glycoprotein of Stomatitis Vesicular Virus and Lyssaviruses

**Keywords :** Viral fusion glycoproteins, Viral entry, Membrane fusion, Structural virology, Rhabdoviruses

**Abstract:** Vesicular stomatitis virus (VSV), an enveloped virus, is the prototype species of the genus Vesiculovirus within the family *Rhabdoviridae*. Its G glycoprotein is responsible for receptor recognition, on the host cell surface, that triggers clathrin-mediated endocytosis of VSV. Then, within the acidic environment of the endosome, VSV G undergoes a fusogenic conformational change from the pre-fusion form of G to its post-fusion form, leading the fusion of both membranes. G is also the target of virus-neutralizing antibodies.

Both structures of the pre- and post-fusion forms of the soluble ectodomain of G (i.e. without its transmembrane part) were determined by radiocrystallography. These structures established G as the prototype of class III fusion glycoproteins. However, the organization of the carboxyterminal part of the ectodomain and the transmembrane domain of G, which play an important role during the fusion process, remains unknown. Therefore, we carried out a cryo-electron microscopy study on the complete glycoprotein, directly purified from viral particles, alone or in complex with a monoclonal antibody. This study led to complete the structures of the ectodomain in its pre- and post-fusion conformations. It also revealed that the transmembrane domains are mobile within the membrane.

We have also solved two structures of G in complex with a FAb derived from a neutralizing antibody, recognizing both pre- and post-fusion forms of G from several strains of Vesiculovirus. Based on these first structures of a complex between G and an antibody, we could characterize the epitope, identify the key G residues in the interaction and propose a neutralization mechanism.

This work significantly increases our knowledge of the structure of G, which is the most widely used glycoprotein in biotechnology for cargo delivery and in gene therapy (by lentivirus pseudotyping).

We also initiated a study aimed at characterizing the glycoproteins of Lyssaviruses, a genus also part of the *Rhabdoviridae* family, and for which rabies virus is the prototype. We produced and purified the ectodomains of several Lyssaviruses, and we were able to obtain a crystallographic structure of the ectodomain of Ikoma virus, which corresponds to a late monomeric intermediate. Several approaches are underway to further characterize this structure.

We also carried out a phage display selection of alphaReps directed against Ikoma G in collaboration with Philippe Minard and Agathe Urvoas team at I2BC. Alphareps are artificial proteins binders consisting of helical repeats. Selected alphareps are currently being characterized. These tools can be used as crystallisation helpers by trapping different conformations of G. They will also serve as tools for cell biology aspects.



## **REMERCIEMENTS**

Je souhaite avant tout remercier DR. Yves Gaudin, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe Rhabdovirus. Je le remercie pour sa bienveillance à mon égard, son écoute et sa compréhension, et aussi ses critiques pertinentes et ses discussions enrichissantes au cours de ces cinq ans passé dans l'équipe.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers mon encadrante, DR. Aurélie Albertini, pour son encadrement au cours de cette thèse et tout le soutien qu'elle m'a apporté, malgré les situations difficiles. Son savoir et savoir-faire ont été une aide extrêmement précieuse.

Je remercie aussi les membres de l'équipe Rhabdovirus que j'ai pu côtoyer pendant ces 3 ans pour leur disponibilité et les précieux conseils qu'ils ont partagés avec moi. En particulier, je remercie aussi énormément Isoline Duquenois, qui était là depuis le début, et avec qui j'ai passé d'excellents moments à la paillasse, et son soutien tout au long de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement Malika Ould-Ali sans qui les travaux de microscopie électronique ne seraient pas possibles, avec qui j'ai énormément appris en trois ans, et avec qui j'ai passé de très bons moments devant le microscope. Merci à Laura aussi, et Anna, pour les échanges que nous avons eus pendant 3 ans, et le temps que vous avez pris à chaque fois pour me répondre et m'aider.

Je remercie à ce titre également Stéphane Bressanelli, pour l'aide précieuse qu'il nous a apporté tout du long avec les machines et le traitement sur cryoSPARC : merci pour ton temps et ta réactivité !

Je remercie également les membres de mon CSI, Sonia Fieulaine, Hélène Malet et Stéphane Roche pour leur écoute et leurs conseils au cours de ces trois ans. Stéphane en particulier, ce fut un honneur de pouvoir échanger avec toi et de poursuivre le travail que tu as initié pendant ta propre thèse !

Je souhaite remercier également mon comité de thèse : Pr. Patrice Gouet et Pr. Isabelle Imbert, en tant que rapporteurs. Merci pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse et avoir tenu bon malgré les problèmes administratifs. Merci également à DR. Bernard Delmas et Pr. Sylvie Nessler, en tant qu'examineurs. Merci à vous tous pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour vos échanges et votre enthousiasme lors de ma soutenance.

Je remercie également Guy Schoehn du groupe Méthodes de microscopie électronique de l'IBS à Grenoble pour avoir accepté de travailler en collaboration avec nous, et Eleftherios Zarkadas, pour vos superbes grilles et les collectes que nous avons pu faire ensemble.

Je tiens également à remercier l'équipe de Philippe Minard et Agathe Urvoas, de l'I2BC, avec qui j'ai également pu collaborer. Merci en particulier à Agathe et Marielle Valerio pour m'avoir formé et encadré pendant mon passage dans leur équipe, et leur patience à mon égard.

Je souhaite également remercier en particulier Magalie Noiray de la plateforme PIM de l'I2BC et Stéphane Plancqueel de la plateforme de cristallographie, avec qui j'ai été amené à collaborer. Magalie, merci pour ne pas avoir baisser les bras et réussi à chaque fois à tirer des données BLI de mes échantillons récalcitrants. Merci pour les échanges que nous avons eu tout du long et ton soutien. Stéphane, merci pour les cribles de cristallogénèse, tes conseils et ta très grande disponibilité !

Je voudrais également remercier les membres du département de virologie, qui m'ont chaleureusement accueilli et aidé au cours de ces trois ans. Merci à tous pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir, et vos conseils, et je vous souhaite le meilleur après ce déménagement pour chacun de vos projets !

Au-delà du plan scientifique, je voudrais partager une pensée pour toutes les belles rencontres que j'ai pu faire au sein de cet institut de recherche au cours de mes trois ans de thèse. En particulier, Hugo, Ariane, Stéphanie, Elena, Melissa, Pavlina et Chloé, merci à vous pour votre soutien et les très bons moments qu'on a pu partager ensemble. Vous avez été une bouffée d'air libre pour moi. Je vous souhaite à tous plein de réussite pour la suite, dans tous vos projets.

Enfin, je souhaite remercier mes amis et ma famille pour leur soutien indéfectible au cours de ces trois ans, que ce soit pour m'entendre parler en boucle de mon projet même quand vous n'y compreniez rien, ou bien pour votre soutien pendant les moments de doutes. Vous avez été mon roc pendant ces trois ans, en particulier mes parents, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Alors voilà, après ça vous trouverez le bilan de ces trois ans avec lesquels je vous ai bassiné. Mais avant, encore une fois, merci à tous, du fond du cœur.

*A mes parents,  
à Majo.*

<b>Introduction</b> .....	0
<b>I. La famille des <i>Rhabdoviridae</i></b> .....	1
A. Généralités et classification .....	1
B. Le virus de la Stomatite Vésiculaire .....	2
1- Phylogénie, écologie et pathogénie des Vésiculovirus .....	2
2- VSV, un outil thérapeutique .....	3
C. Les Lyssavirus .....	5
1- Phylogénie et écologie des Lyssavirus .....	5
2- Pathogénèse et prophylaxie .....	6
D. Organisation de la particule virale et des composants des Rhabdovirus .....	8
1- Organisation du génome des Rhabdovirus .....	8
2- Organisation de la particule virale des Rhabdovirus .....	8
3- Les constituants viraux .....	9
E. Cycle viral des Rhabdovirus .....	19
1- Présentation du cycle viral .....	19
2- Reconnaissance et liaison au récepteur cellulaire .....	20
3- Endocytose et fusion membranaire .....	22
<b>II. La machinerie de fusion virale</b> .....	24
A. La fusion membranaire .....	24
B. Les protéines de fusion virales .....	25
1- Généralités .....	25
2- Les glycoprotéines de fusion virales de classe I .....	26
3- Les glycoprotéines de fusion virales de classe II .....	32
4- Les glycoprotéines de fusion virales de classe III .....	37
5- Importance des segments des glycoprotéines virales interagissant avec les membranes ...	40
C. Spécificités de la machinerie de fusion des Rhabdovirus .....	42
1- Propriétés de fusion des glycoprotéines de Vésiculovirus et Lyssavirus, de classe III .....	42
2- Une coopérativité nécessaire au processus de fusion .....	43
3- Modalités d'interaction des boucles de fusion avec les membranes .....	45
4- Interrupteurs sensibles au pH .....	47
5- Importance du domaine transmembranaire et du domaine proximal à la membrane lors du processus de fusion membranaire médiée par G .....	49
6- Intermédiaires de G durant la transition structurale .....	54
<b>III. Antigénicité des Rhabdovirus</b> .....	57
A. Pourquoi s'y intéresser ? .....	57
B. Antigénicité de VSV et RABV .....	58



1-	Épitopes de neutralisation de VSV G .....	58
2-	Épitopes de neutralisation de RABV G.....	60
C.	Concepts sur la neutralisation des virus par les anticorps .....	63
1-	Un problème de définition.....	63
2-	Anticorps polyclonaux vs. monoclonaux .....	63
3-	Les fonctions effectrices des anticorps.....	64
4-	Stœchiométrie de la neutralisation virale par les anticorps .....	68
	<b>Résultats</b> .....	73
	<b>Résultats I.</b> Étude de la structure complète de VSV G et caractérisation du complexe de G avec un anticorps neutralisant .....	74
I.	<b>Article en cours de soumission</b> .....	74
II.	<b>Compléments sur l'étude de VSV G entière - à la recherche du domaine transmembranaire de G</b> .....	106
III.	<b>Conclusion et perspectives</b> .....	111
	Choix du système d'étude .....	111
	Mécanisme de fusion de VSV G .....	113
	Antigénicité.....	119
	<b>Résultats II.</b> Étude structurale de la glycoprotéine des Lyssavirus .....	127
I.	<b>Contexte du travail mené</b> .....	128
II.	<b>Matériel et méthodes</b> .....	130
III.	<b>Étude fonctionnelle de la G des Lyssavirus</b> .....	135
IV.	<b>Étude structurale de la G des Lyssavirus</b> .....	137
A.	Expression, purification et caractérisation des ectodomains de EBLV1 G, LBV G et Ikoma G .....	137
B.	Détermination de la structure de Ikoma G <sub>1-440</sub> * .....	140
C.	Résidus impliqués dans la transition structurale de Ikoma G .....	147
D.	Antigénicité de Ikoma G <sub>1-440</sub> .....	153
V.	<b>Sélection de binders contre l'ectodomaine de Ikoma G<sub>1-440</sub>*</b> .....	157
A.	De la nécessité de binders contre les LYSV G .....	157
B.	Sélection d'αReps dirigées contre Ikoma G <sub>1-440</sub> * .....	159
C.	Tests d'interaction entre les αReps sélectionnées et Ikoma G <sub>1-440</sub> * .....	160
VI.	<b>Conclusions et perspectives</b> .....	163
	Machinerie de fusion .....	163
	Antigénicité.....	168
	<b>Annexes</b> .....	171
	<b>Bibliographie</b> .....	174

## Table des figures

---

Figure 1. Structure de la particule virale des Rhabdovirus et organisation du génome viral .....	1
Figure 2. Phylogénie des Vésiculovirus .....	2
Figure 3. Phylogénie des Lyssavirus .....	5
Figure 4. Cycle d'infection et neuro-invasion du virus de la rage .....	6
Figure 5. Organisation des génomes de Vésiculovirus et Lyssavirus .....	8
Figure 6. Organisation de la particule virale de VSV .....	9
Figure 7. Structure et organisation des sous-unités de N et M chez VSV .....	11
Figure 8. Organisation de la phosphoprotéine P des Rhabdovirus .....	13
Figure 9. La polymérase L des Vésiculovirus .....	15
Figure 10. Organisation de la protéine de matrice M de VSV .....	17
Figure 11. Organisation de la glycoprotéine G de VSV .....	18
Figure 12. Cycle viral des Rhabdovirus .....	19
Figure 13. Structures de VSV G en complexe avec le récepteur LDLR .....	20
Figure 14. Récepteurs proposés de RABV .....	21
Figure 15. Voies proposées pour l'entrée de VSV dans la cellule hôte .....	23
Figure 16. Modèle de fusion membranaire par hémifusion .....	24
Figure 17. Organisation des glycoprotéines fusogènes représentatives de la classe I .....	27
Figure 18. Structures des glycoprotéines de classe I .....	30
Figure 19. Mécanisme de fusion des glycoprotéines de classe I .....	32
Figure 20. Modèle de maturation des glycoprotéines de classe II guidé par l'effondrement de la protéine chaperonne prM chez le virus Binjari .....	34
Figure 21. Structures des glycoprotéines de classe II .....	35
Figure 22. Mécanisme de fusion proposé pour les glycoprotéines de fusion des Flavivirus (classe II) .....	36
Figure 23. Structure des glycoprotéines de classe III (page suivante) .....	38
Figure 24. Organisation du TMD et de la MPER de glycoprotéines de fusion de classe I, II et III .....	42
Figure 25. Les réseaux formés par la G des Rhabdovirus .....	45
Figure 26. Organisation des boucles de fusion des glycoprotéines de classe III .....	46
Figure 27. Interrupteurs moléculaires sensibles au pH chez VSV G .....	48
Figure 28. Interrupteurs moléculaires sensibles au pH chez G des Lyssavirus .....	49
Figure 29. Structure cristalline de la MPER de VSV G à haut pH .....	51
Figure 30. Modèle montrant le rôle des glycines au niveau du TMD de VSV G pendant la fusion ...	52
Figure 31. Structure trimérique post-fusion complète de la gB de HSV-1 et rôle putatif du domaine intraviral .....	53
Figure 32. G adopte des conformations intermédiaires au cours de sa transition .....	56
Figure 33. Sites antigéniques de VSV G .....	60
Figure 34. Sites antigéniques de RABV G .....	62
Figure 35. Mécanismes de neutralisation des virus enveloppés par les anticorps neutralisants .....	65
Figure 36. Fonctions effectrices médiées par le fragment Fc des anticorps .....	67
Figure 37. Organisation des IgG humaines .....	70
Figure 38. Flexibilité des domaines CTD, TMD et ICD de VSV G .....	107
Figure 39. Exemple de classes 3D présentant l'organisation de la micelle de VSV G à pH acide .....	108
Figure 40. Résultats de l'analyse 3DVA effectuée sur VSV G à pH acide .....	109
Figure 41. Exemple de résultats de l'analyse 3DFLEX effectuée sur VSV G à pH acide .....	110
Figure 42. Systèmes mimétiques de la membrane lipidique .....	112

Figure 43. Alignement de séquence des segments CTD/MPER et TMD au sein du genre Vésiculovirus et entre les glycoprotéines de classe III .....	114
Figure 44. Prédiction de la structure de VSV G par AlphaFold2 .....	116
Figure 45. Modèle du processus de fusion membranaire médié par la G des Vésiculobirus .....	117
Figure 46. Caractère pan-neutralisant de 8G5F11 .....	119
Figure 47. Conservation de la structure 3D de l'épitope reconnu par 8G5F11 au sein de G des Vésiculovirus .....	121
Figure 48. Localisation de l'épitope reconnu par 8G5F11 et du site de reconnaissance du LDLR sur VSVI G .....	122
Figure 49. Potentiel mécanisme de neutralisation de VSV par le mAb 8G5F11 .....	123
Figure 50. Test de fusion tricolore proposé pour l'étude du mécanisme de neutralisation de VSVI par le mAb 8G5F11 .....	125
Figure 51. Structures résolues des LYSV G .....	129
Figure 52. LYSV G étudiées au laboratoire .....	129
Figure 53. Les séquences des LYSV G choisis pour cette étude sont fonctionnelles .....	136
Figure 54. Expression et purification des LYSV G <sub>1-440</sub> * .....	138
Figure 55. Morphologie des LYSV G <sub>1-440</sub> * en coloration négative à pH 7,0 et pH 5,0 .....	139
Figure 56. Alignement de séquences des LYSV G dont la structure a été résolue .....	143
Figure 57. Structure du protomère post-fusion de Ikoma G <sub>1-440</sub> * .....	143
Figure 58. Comparaison de l'organisation de Ikoma G <sub>1-440</sub> * avec les structures résolues de LYSV G et de G des Vésiculovirus .....	145
Figure 59. Comparaison de la localisation des résidus permettant la stabilisation de G dans sa conformation post-fusion .....	147
Figure 60. Comparaison du motif de trimérisation de Ikoma G <sub>1-440</sub> * et MOKV G <sub>1-440</sub> * à pH acide .....	149
Figure 61. Modélisation du trimère post-fusion de Ikoma G <sub>1-440</sub> par AlphaFold2 .....	151
Figure 62. Sites antigéniques de RABV G positionnés sur l'ectodomaine de Ikoma G .....	154
Figure 63. Modélisation du complexe RVC20 – Ikoma G .....	156
Figure 64. Organisation d'une $\alpha$ Rep .....	158
Figure 65. Sélection par phage display d' $\alpha$ Reps dirigées contre Ikoma G <sub>1-440</sub> * .....	159
Figure 66. Test d'interaction par <i>pull-down</i> des $\alpha$ Reps sélectionnées contre Ikoma G <sub>1-440</sub> * .....	161
Figure 67. Réseaux hélicoïdaux formés par les LYSV G à bas pH .....	164
Figure 68. Localisation de l'histidine 270 .....	166
Figure 69. Étude <i>in-silico</i> d'un potentiel épitope pan-Lyssavirus .....	169

## Tables

Table 1. Récapitulatif des résidus impliqués dans le processus de fusion membranaire médié par VSV G .....	118
Table 2. Conservation de la structure du domaine PHD des Vésiculovirus .....	120
Table 3. Données collectées et statistiques d'affinement .....	141
Table 4. Conservation de la structure des domaines FD, PHD et TrD des LYSV G .....	144
Table 5. Comparaison des modèles de trimères post-fusion de Ikoma G <sub>1-440</sub> générés par AlphaFold2 et la structure cristallographique du protomère Ikoma G <sub>1-440</sub> * .....	150
Table 6. 6 $\alpha$ Reps sélectionnées contre Ikoma G <sub>1-440</sub> * à l'issu du criblage par phage ELISA .....	160

## Liste des abréviations

---

<b>CHAV</b>	Virus Chandipura
<b>CR</b>	Domaine riche en cystéine
<b>Cryo-EM</b>	Cryo-microscopie électronique
<b>Cryo-ET</b>	Cryo-tomographie électronique
<b>CTD</b>	Domaine carboxy-terminal de l'ectodomaine de G
<b>EBLV-1</b>	Virus de la chauve-souris européenne 1
<b>EI</b>	Etat intermédiaire précoce de G
<b>FAb</b>	<i>Fragment antigen-binding region</i>
<b>FD</b>	Domaine de fusion de G
<b>FL</b>	Boucles de fusion de G
<b>G</b>	Glycoprotéine virale fusogène de classe III
<b>G<sub>1-440</sub>*</b>	Ectodomaine (résidus 1 à 440) muté au niveau des boucles de fusion
<b>gB</b>	Glycoprotéine fusogène de HSV-1
<b>G<sub>ect</sub></b>	Ectodomaine de G
<b>G<sub>th</sub></b>	Ectodomaine thermolysé de G
<b>HA</b>	Hemagglutinine
<b>HSV-1</b>	Virus Herpes simplexe 1
<b>ICD</b>	Domaine intraviral de G
<b>LBV</b>	Virus de la chauve-souris de Lagos
<b>LDLR</b>	Récepteur des lipoprotéines de basse densité
<b>LI</b>	Etat intermédiaire tardif de G
<b>LYSV</b>	Lyssavirus
<b>mAb</b>	Anticorps monoclonal
<b>MOKV</b>	Virus Mokola
<b>PHD</b>	Domaine d'homologie à la pleckstrine de G
<b>RABV</b>	Virus de la rage
<b>RHABV</b>	Rhabdovirus
<b>SPA</b>	Single particle analysis
<b>TM – TMD</b>	Domaine transmembranaire de G
<b>TrD</b>	Domaine de trimérisation de G
<b>VSV</b>	Virus de la Stomatite vésiculaire
<b>VSVI</b>	VSV sérotype Indiana

# Introduction

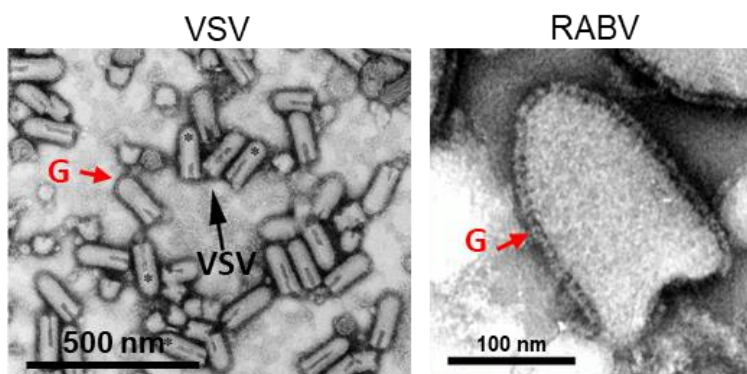
# I. La famille des *Rhabdoviridae*

## A. Généralités et classification

La famille des *Rhabdoviridae*, de l'ordre des *Mononegavirales*, constitue une grande famille virale (434 espèces, ICTV, mai 2024) présentant un large tropisme et une grande diversité d'hôtes vertébrés et invertébrés (mammifères, insectes, poissons, crustacés, reptiles, oiseaux, arachnides) et plantes terrestres et aquatiques (Dietzgen et al., 2017). Les Rhabdovirus (RHABV) sont organisés en trois sous-familles (*Alpharhabdovirinae*, *Betarhabdovirinae*, *Gammarhabdovirinae*) et 46 genres (Amarasinghe et al., 2019) selon l'analyse phylogénétique de leur protéine ARN-polymérase-ARN dépendante L (**voir I.D**) (ICTV, mai 2024). Au sein d'un même genre, qui constitue un clade monophylétique, les virus partagent généralement une architecture génomique, une morphologie, un spectre d'hôtes et des modes de transmissions et de répliquions similaires.

La famille des Rhabdovirus, notamment la sous-famille des Alpharhabdovirus, comprend de nombreux pathogènes économiquement importants en santé publique, agriculture et pêche (Shepherd et al., 2023). On retrouve parmi eux le virus de la stomatite vésiculaire Indiana (VSV), appartenant au genre Vésiculovirus, et le virus de la rage (RABV), appartenant au genre Lyssavirus (LYSV), qui sont les prototypes des Rhabdovirus dits classiques (Dietzgen et al., 2017).

Les Rhabdovirus ont une forme caractéristique en obus (observable par microscopie électronique (EM)), présentant une base plate et une extrémité arrondie (**Figure 1.A&B**) avec un diamètre de ~75 nm et une longueur de 100-300 nm (Matsumo, 1962, Tordo et al., 1998). Ces virus enveloppés possèdent un génome non segmenté constitué d'un ARN simple brin de polarité négative de ~10 à 16 kb (Walker et al., 2015). A la surface des particules virales, seule la glycoprotéine virale G est présente et constitue les spicules visibles (**Figure 1**).



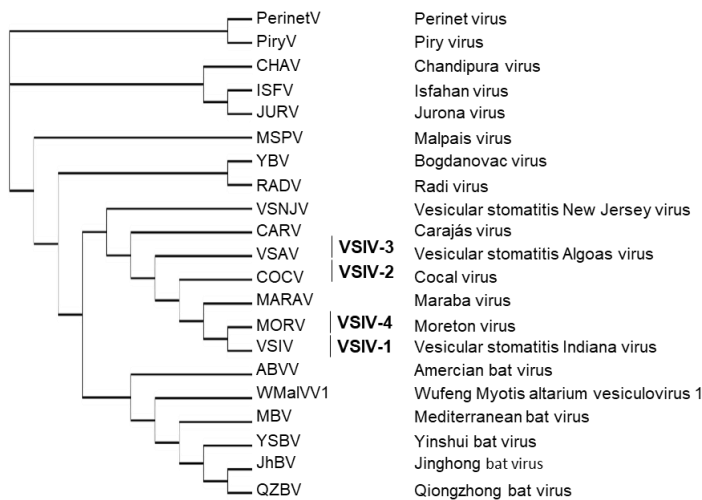
**Figure 1. Structure de la particule virale des Rhabdovirus et organisation du génome viral**

Micrographie électronique de particules virales de Rhabdovirus en coloration négative (gauche, VSV, Libersou et al., 2010 ; droite, RABV, R. Ruigrok). La glycoprotéine G, seule protéine virale présente à la surface des particules, est indiquée par une flèche rouge.

## B. Le virus de la Stomatite Vésiculaire

### 1- Phylogénie, écologie et pathogénie des Vésiculovirus

Le genre Vésiculovirus regroupe actuellement 21 espèces (ICTV, mai 2024) (Figure 2). Ils ont été classés en sérotypes selon leur antigénicité (Kelley et al., 1972, Tesh et al., 1977, Lefrancois et Lyles, 1982).



**Figure 2. Phylogénie des Vésiculovirus**

Arbre phylogénétique des principaux Vésiculovirus basé sur l'analyse de la séquence de leur protéine L et de leur antigénicité (ICTV, 2016). Le sérotype VSV Indiana est divisé en quatre complexes sérologiques distincts : VSIV 1 représenté par le virus de la stomatite vésiculaire Indiana classique (VSIV), VSIV 2 représenté par le virus Cocal (COCV), VSIV 3 représenté par le virus de la stomatite vésiculaire Algoas (VSAV) et VSIV 4 représenté par le virus Morreton (MORV).

Les Vésiculovirus sont des arbovirus zoonotiques qui infectent principalement les rongeurs, les bovins, les porcs et les chevaux (Rodriguez and Pauszek 2012). Le cycle naturel des Vésiculovirus n'est actuellement pas connu. Leur transmission à l'homme est possible (Dietzgen et al., 2017).

Plusieurs Vésiculovirus sont pathogènes chez les hôtes qu'ils infectent. Les sérotypes New Jersey et Indiana sont responsables de stomatites vésiculaires. Il s'agit d'une pathologie principalement caractérisée par l'apparition de lésions vésiculaires sur les muqueuses buccales, les sabots, les tétines et le prépuce chez le bétail (rongeurs, bovins, porcs, chevaux (Rodriguez and Pauszek, 2012). Chez l'humain, la maladie n'entraîne que rarement l'apparition de symptômes graves (Letchworth et al., 1999). Ces virus sont endémiques en Amérique Centrale et dans la partie Nord-Ouest de l'Amérique du Sud (Shepherd et al., 2023).

Le virus Chandipura (CHAV), le virus Isfahan et le virus Piry sont associés au développement de syndromes grippaux chez l'humain (Manghani et al., 1986, Sejvar, 2006). Le virus Chandipura est aussi associé à des épidémies d'encéphalites mortelles dans plusieurs parties de l'Inde, notamment chez les enfants (revues dans Basak et al., 2007). Néanmoins, le rôle de CHAV comme agent encéphalique est actuellement débattu (revu dans Sheperd et al., 2023).

## **2- VSV, un outil thérapeutique**

### **a. VSV comme vecteur vaccinal**

VSV possède un génome de petite taille, facile à manipuler et qui peut exprimer de façon stable jusqu'à 4 à 5 kb de matériel génétique supplémentaire grâce à des systèmes bien établis de génétique inverse permettant la récupération des virus (Schnell et al., 1996, Scher et Schnell, 2020). Le virus recombinant peut être produit efficacement et rapidement grâce à la rapidité de son cycle de réplication (Whitlow et al., 2006, Black et al., 1994). Si VSV n'est généralement pas responsable de pathologies majeures graves, les vecteurs viraux basés sur VSV induisent en revanche généralement une réponse d'anticorps neutralisants (Hangartner et al., 2006, Power et al., 2007, Scher et Schnell, 2020). Du fait de son mécanisme de bourgeonnement qui ne nécessite pas G (voir **I-D.3.2.a**), il est possible de produire des particules virales dans lesquelles VSV G est facilement remplacée par une autre glycoprotéine d'enveloppe. Ces propriétés font de VSV un vecteur intéressant pour le développement de thérapies vaccinales, dont les candidats sont revus dans Scher et Schnell, 2020, Stubbs et al., 2021. Un des succès les plus notables de l'utilisation de VSV comme plateforme vaccinale est le développement du vaccin anti-Ebola Ervebo dans lequel G de VSV est remplacée par la glycoprotéine GP du virus Ebola (souche Zaire Z), rVSVΔG-ZEBOV-GP. Ervebo présente une efficacité vaccinale de 70 à 100% (WHO, 2019) et est aujourd'hui approuvé par la FDA (2019) et par l'Union Européenne (2019).

### **b. Un virus oncolytique**

VSV est un virus oncolytique capable d'induire rapidement l'apoptose des cellules infectées, notamment sous l'activité de sa protéine de matrice M (revue dans Bishnoi et al., 2018.) et de sa glycoprotéine G, à l'origine d'une réponse antitumorale cytotoxique des lymphocytes T importante contre les protéines virales et les antigènes associés aux tumeurs, entraînant un effet antitumoral sur le long terme. D'autres mécanismes permettant la régression des tumeurs sont également mis en jeu (revus dans Bishnoi et al., 2018). VSV est sensible aux interférons et se réplique préférentiellement dans les cellules qui en sont déficientes (Stojdl et al., 2000), ce qui est le cas de beaucoup de cellules cancéreuses. Son large tropisme cellulaire (Dietzschold et al., 1996) et sa capacité à exprimer stablement des gènes étrangers renforcent l'attrait de VSV pour le développement de thérapies oncolytiques. Plusieurs approches ont été développées et sont revues dans Bishnoi et al., 2018.



c. **La glycoprotéine G de VSV, un outil biotechnologique incontournable en thérapie cellulaire**

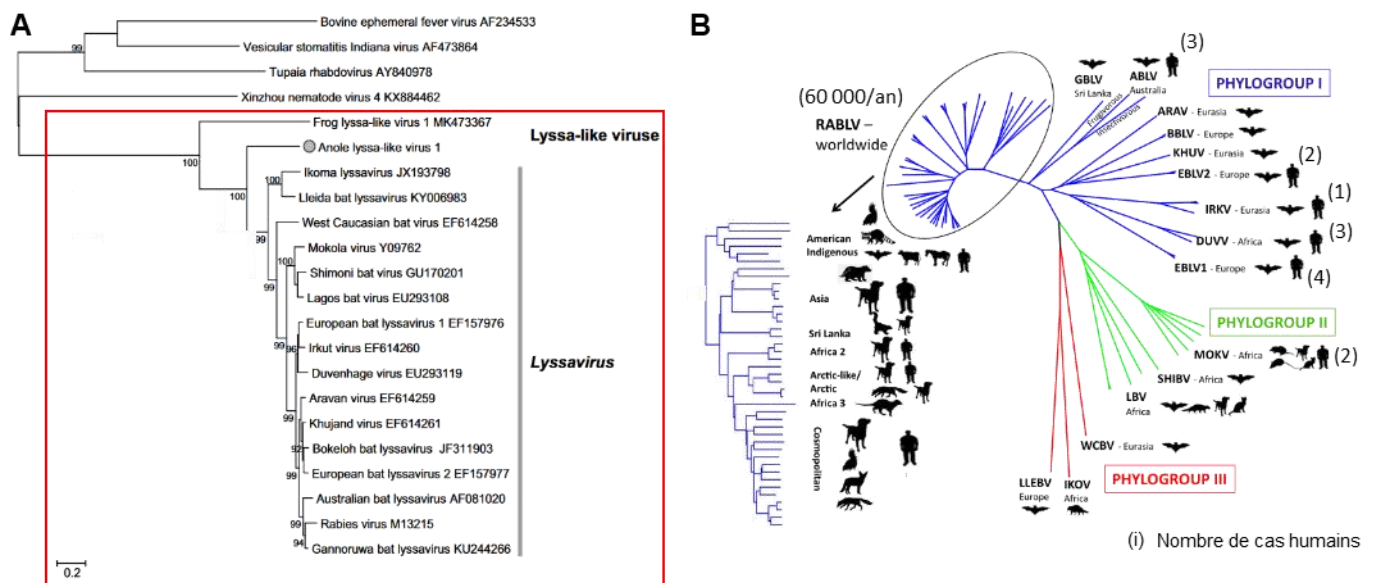
VSV G est la protéine d'enveloppe la plus couramment utilisée pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux (LV) du fait de sa stabilité, les titres élevés de vecteurs produits (Munis et al., 2020) et sa capacité de fusion élevée. Les vecteurs lentiviraux pseudotypés avec G de VSV (LVG) utilisent le récepteur LDLR comme récepteur pour entrer dans les cellules cibles (voir I-E). Le LDLR, ubiquitaire, est notamment régulé à la hausse chez les lymphocytes T activés. Les LVG sont ainsi largement utilisés pour générer des CART-cells *ex vivo*, après purification et activation des lymphocytes T (Sadelin et al., 2017).

VSV G peut également être utilisée comme outil de reciblage à la surface de vésicules cellulaires dans une optique de délivrance ciblée d'un cargo thérapeutique (Zeng et al., 2024). Par exemple, Zeng et al., 2024, ont ainsi développé avec succès des vésicules extracellulaires décorées de VSV G capables de délivrées aussi bien *in vivo* que *in vitro* de CRISPR/Cas9 dans des cellules/souris infectées par HBV, conduisant à l'élimination de l'ADNcc épisomal et intégré de HBV (Zeng et al., 2024). Ce travail ouvre notamment la voie pour de nouvelles approches thérapeutiques et de nano délivrance.

## C. Les Lyssavirus

### 1- Phylogénie et écologie des Lyssavirus

Le genre Lyssavirus (LYSV) regroupe actuellement 18 espèces virales réparties en trois phylogroupes selon leur antigénicité et leur distance génétique basée sur l'analyse phylogénétique de leur protéine N (ICTV, 2024). Le phylogroupe I inclut notamment le virus de la rage (RABV). Les LYSV les plus divergents, soient le virus de la chauve-souris ouest caucasienne (WCBV), le virus Ikoma (IKOV) et le virus Lleida (LLBV), n'appartiennent à aucun de ces phylogroupes (ICTV, 2024) (**Figure 3.A**).



**Figure 3. Phylogénie des Lyssavirus**

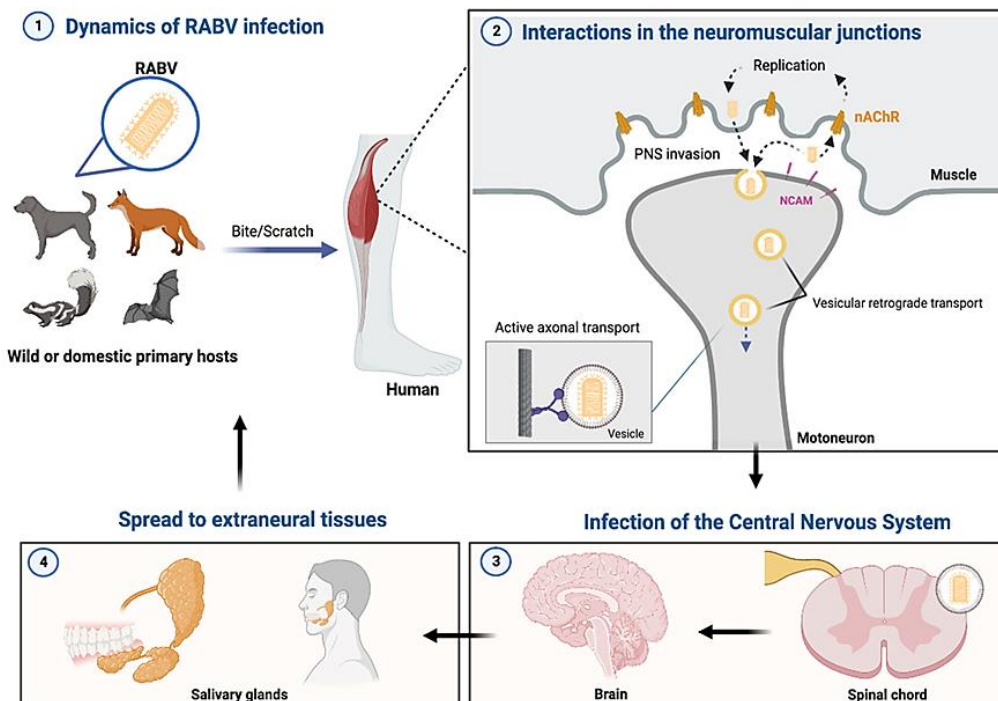
(A) Arbre phylogénétique des LYSV et LYSV-like (Extrait de Masayuki et al., 2021). (B) Organisation en phylogroupe des Lyssavirus. Les cas humains sont indiqués. (Adapté de Banyard et al., 2019)

Les LYSV infectent exclusivement les mammifères terrestres. Les chauves-souris insectivores (ordre *Chiroptera*) en sont le réservoir principal (ICTV, 2024), à l'exception des virus Ikoma et Mokola pour lesquels les réservoirs naturels n'ont pas encore été identifiés (Banyard et al., 2011). Les *spillovers* des LYSV dans des espèces différentes des réservoirs identifiés conduisent dans la grande majorité des cas à une impasse dans la chaîne de transmission (Marston et al., 2017, Marston et al., 2018). RABV, lui, ayant pour réservoir initial des chauves-souris insectivores hématoiphages d'Amérique du Sud, est capable de s'adapter plus facilement à de nouveaux hôtes que les autres LYSV et est actuellement maintenu dans des cycles de transmission chez des carnivores comme les chiens, renards et rats laveurs (Badrane et Tordo, 2001, Rupprecht et al., 2011, Fisher et al., 2018). L'existence de cycles de transmission de RABV chez des primates non humains est supposée, mais reste à prouver (Kotait, 2019). Géographiquement, la rage classique est présente sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique, les Lyssavirus autres que RABV sont eux endémiques en Europe, Afrique, Asie et Océanie (Fisher et al., 2018).

## 2- Pathogénèse et prophylaxie

Les Lyssavirus sont des agents pathogènes neurotropes, neuroinvasifs et neurovirulents responsables d'encéphalites presque toujours mortelles (Fooks et al., 2017). La rage, maladie négligée, est responsable de près de 59 000 décès dans le monde chaque année (Fooks et al., 2017). Plusieurs cas de transmission à l'Homme de LYSV autres que RABV ont été rapportés (Shepherd et al., 2023) (**Figure 3.B**). Le dernier cas européen date de 2019 : une infection par EBLV-1 a été constatée post-mortem sur un homme de nationalité française qui présentait une encéphalite et qui était entré en contact avec une espèce non renseignée de chauves-souris à son domicile (Regnault et al., 2022).

Les Lyssavirus sont principalement transmis suite à une morsure, par contact avec la salive d'un animal infecté ou la contamination d'une plaie par léchage (**Figure 4**). Ils se répliquent initialement au niveau du site d'inoculation (Murphy and Bauer 1974), atteignent ensuite les extrémités non myélinisées des motoneurons ou neurones sensitifs à proximité, puis se propagent par transport axonal rétrograde jusqu'au corps des neurones du système nerveux central (CNS), ce qui protège les virus contre le système immunitaire de l'hôte et donc limitant la réponse anticorps précoce (Johnson et al., 2010). Une fois dans le CNS, une réplication virale intense, associée au développement de la pathologie, se met en place (Jackson 2013). La fin de l'infection est caractérisée par une dissémination inverse du virus à partir du CNS vers plusieurs organes et tissus dont les glandes salivaires (Murphy, 1977, Jackson et al., 1999, Jackson, 2013) (**Figure 4**).



**Figure 4. Cycle d'infection et neuro-invasion du virus de la rage**

Extrait de Bastos et al., 2023. **(1)** Une fois inoculé, **(2)** RABV se réplique au niveau du site d'inoculation musculaire chez l'hôte puis envahit les nerfs périphériques et est **(3)** transporté jusqu'au système nerveux central (CNS). RABV infecte également les tissus extraneuraux, **(4)** notamment les glandes salivaires, ce qui facilite sa transmission à d'autres hôtes.

La pathologie développée au cours de l'infection par RABV diffère fortement de la plupart des pathologies virales ou bactériennes affectant le CNS (Dietzschold et al., 2008). Ces dernières sont normalement caractérisées par une réponse immunitaire forte et des lésions pathologiques majeures (Dietzschold et al., 2008). Dans le cas d'une infection par RABV, les lésions pathologiques sont peu présentes (la conservation des structures des neurones contribue à l'évasion de la réponse immunitaire) (Fooks et al., 2017), mais la progression de l'infection est caractérisée par un dysfonctionnement neuronal qui s'accroît au cours de la maladie. Ce dysfonctionnement est caractérisé par :

- une diminution importante de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation neuronale, l'activité synaptique et des changements morphologiques (Kim et al., 2021a),
- une neurotransmission défectueuse (Ceccaldi et al., 1993, Bouzamondo et al., 1993),
- une perturbation de la propagation des potentiels d'action de long des neurones (Gourmelon et al., 1991, Ceccaldi et al., 1993, Fu et Jackson, 2005).

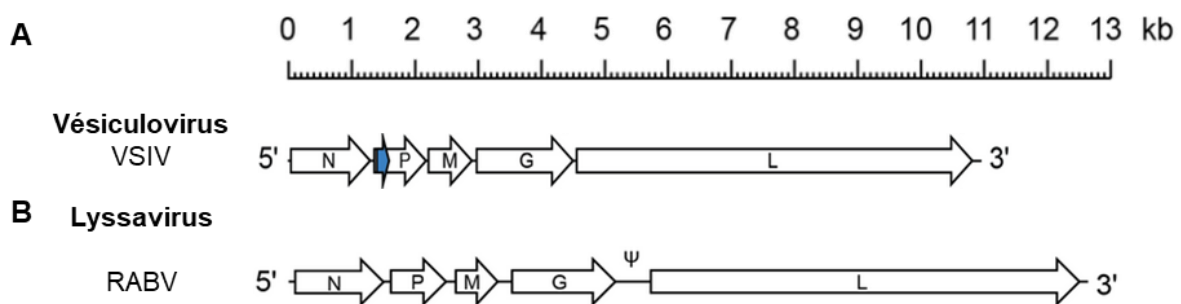
Les mécanismes mis en jeu par RABV pour échapper aux réponses antivirales des cellules et organismes hôtes sont revus dans Bastos et al., 2018.

Suite à l'exposition au virus de la rage, les patients présentent d'abord une phase d'incubation asymptomatique qui peut varier de quelques jours à quelques mois en fonction de la charge virale reçue, et est en moyenne de deux mois. En revanche, la phase symptomatique est beaucoup plus rapide, de une à deux semaines (Udow et al., 2013). De très rares cas de survie après apparition des symptômes ont été rapportés (Jackson et al., 2003). Néanmoins, il est établi que l'apparition des symptômes conduit à une issue systématiquement fatale : il n'existe actuellement pas de traitement curatif disponible sur le marché. Actuellement, les traitements disponibles contre le virus de la rage peuvent être préventifs et/ou prophylactiques. Les vaccins et les immunoglobulines antirabiques disponibles ciblent principalement la glycoprotéine G de RABV, qui en est l'antigène majeur. Ils confèrent une protection contre les LYSV du phylogroupe I mais pas contre les autres phylogroupes (Ertl HCJ, 2019, de Melo et al., 2022, Weyer et al., 2008, Shi et al., 2022). En effet, les glycoprotéines G de Lyssavirus appartenant au même phylogroupe partagent 70% d'identité de séquence, et seulement 50% entre phylogroupes différents (Evans et al., 2012).

## **D. Organisation de la particule virale et des composants des Rhabdovirus**

### **1- Organisation du génome des Rhabdovirus**

Les Vésiculovirus et les Lyssavirus possèdent un génome constitué d'un ARN simple brin de polarité négative de 10,7-11,3 Kb et de 11,9-12,3 kb respectivement (Walker et al., 2015). Caractéristique des Rhabdovirus, l'ARN viral des deux genres porte 5 gènes séparés par une courte région intergénique et encadrés par des séquences leader (3') et trailer (5') hautement conservées. Le génome viral code pour cinq protéines structurales multifonctionnelles, dans l'ordre 3'-N-P-M-G-L-5', avec la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la glycoprotéine (G) et l'ARN-polymérase ARN-dépendante (L) (**Figure 5**) (Walker et al., 2015).



**Figure 5. Organisation des génomes de Vésiculovirus et Lyssavirus**

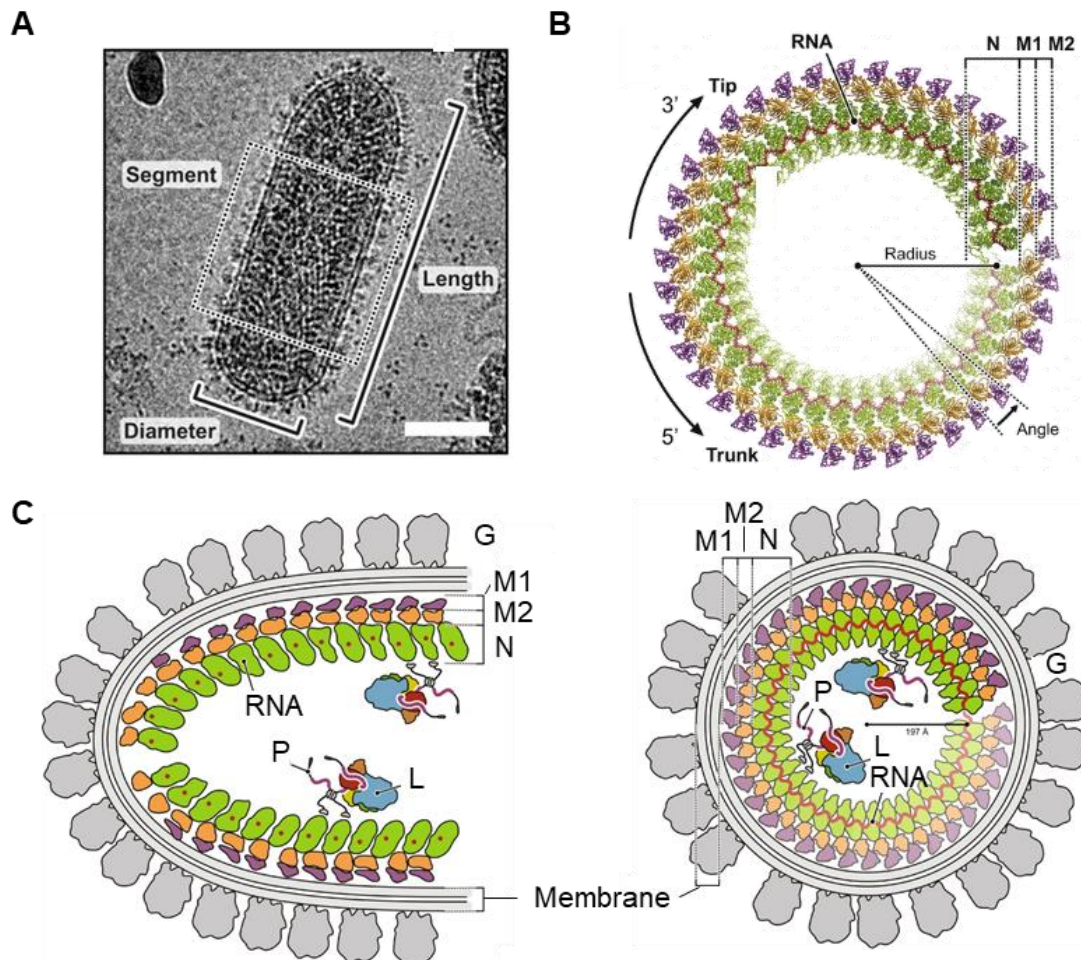
ICTV, mai 2024. **(A)** Organisation du génome du virus de VSV Indiana, prototype des Vésiculovirus. **(B)** Organisation du génome de RABV, prototype des Lyssavirus.  $\psi$  correspond à un pseudogène non traduit.

### **2- Organisation de la particule virale des Rhabdovirus**

Les cinq protéines structurales N, P, M, G et L sont toutes présentes dans les virions des Rhabdovirus. L'observation par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) et cryo-tomographie électronique (cryo-ET) du virion de VSV (Peng Ge et al., 2010, Zhou et al., 2022, Jenni et al., 2022) a permis de décrire l'organisation et l'interaction entre ces différents composants, et de proposer un mécanisme d'assemblage des particules virales de VSV aboutissant à leur forme caractéristique (Zhou et al., 2022, Jenni et al., 2022) (**Figure 6**).

Les travaux de Schoehn et al., 2001, Green et al., 2006, et Albertini et al., 2006, ont montré que l'ARN est encapsidé en hélice au cœur de la particule virale par association avec la nucléoprotéine N, pour former la nucléocapside. Chaque protomère de N lie 9 nucléotides (Schoehn et al., 2001). La protéine P s'associe à la N de la nucléocapside et la L pour former la ribonucléoprotéine (RNP), complexe constituant l'unité de réplication (Albertini et al., 2006, Si et al., 2022). Cette dernière s'enroule en une structure de forme hélicoïdale à l'intérieur de la particule virale. La RNP interagit avec la membrane virale à l'extrémité du virion, s'enroule d'abord avec un diamètre croissant sur huit tours

avant d'atteindre son diamètre hélicoïdal régulier (**Figure 6**) (Jenni et al., 2022). La protéine de matrice M permet de relier la RNP à la glycoprotéine G qui est ancrée dans la membrane lipidique du virion. G est présente en 300 à 400 copies à la surface du virion (Thomas et al., 1985). Environ 50 copies de la polymérase L sont présentes dans les virions matures de VSV (Thomas et al., 1985). Elles sont associées à leur cofacteur P à l'intérieur de la RNP hélicoïdale (**Figure 6**).



**Figure 6. Organisation de la particule virale de VSV**

Extrait de Jenni et al., 2022. **(A)** Micrographie (cryo-EM) présentant la particule virale de VSV à haut pH. **(B)** Vue du dessus de l'hélice formée par la nucléocapside avec 38,5 sous-unités de N/tour. **(C)** Coupe longitudinale montrant la pointe du virion (gauche) et coupe transversale du tronc hélicoïdal du virion (droite). Les protéines sont représentées à l'échelle. Un anneau de RNP est entouré par deux anneaux de M, M1 et M2. La couche M1 permet la liaison avec la RNP (N 1:3 M1), tandis que la couche M2 (M1 1:2 M2) permet la liaison avec la membrane lipidique des virions et/ou la partie ICD des glycoprotéines G présentes à la surface de la particule.

### 3- Les constituants viraux

#### 3.1. Les protéines virales de la ribonucléoprotéine

La ribonucléoprotéine virale (RNP) est le complexe formé par la nucléocapside virale (association de l'ARN viral et de la nucléoprotéine N) et l'ARN-polymérase-ARN-dépendante L associée à son cofacteur P. La nucléocapside sert de matrice à l'ARN-polymérase-ARN-dépendante L.

### a. La nucléoprotéine N

La nucléoprotéine N (50-60 kDa) est une protéine principalement basique (Albertini et al., 2006). N est multifonctionnelle : elle joue un rôle structural, intervient dans la régulation de la traduction et la réplication du génome virale. Elle intervient aussi dans l'échappement à la réponse immunitaire chez RABV (Blondel et al., 2015).

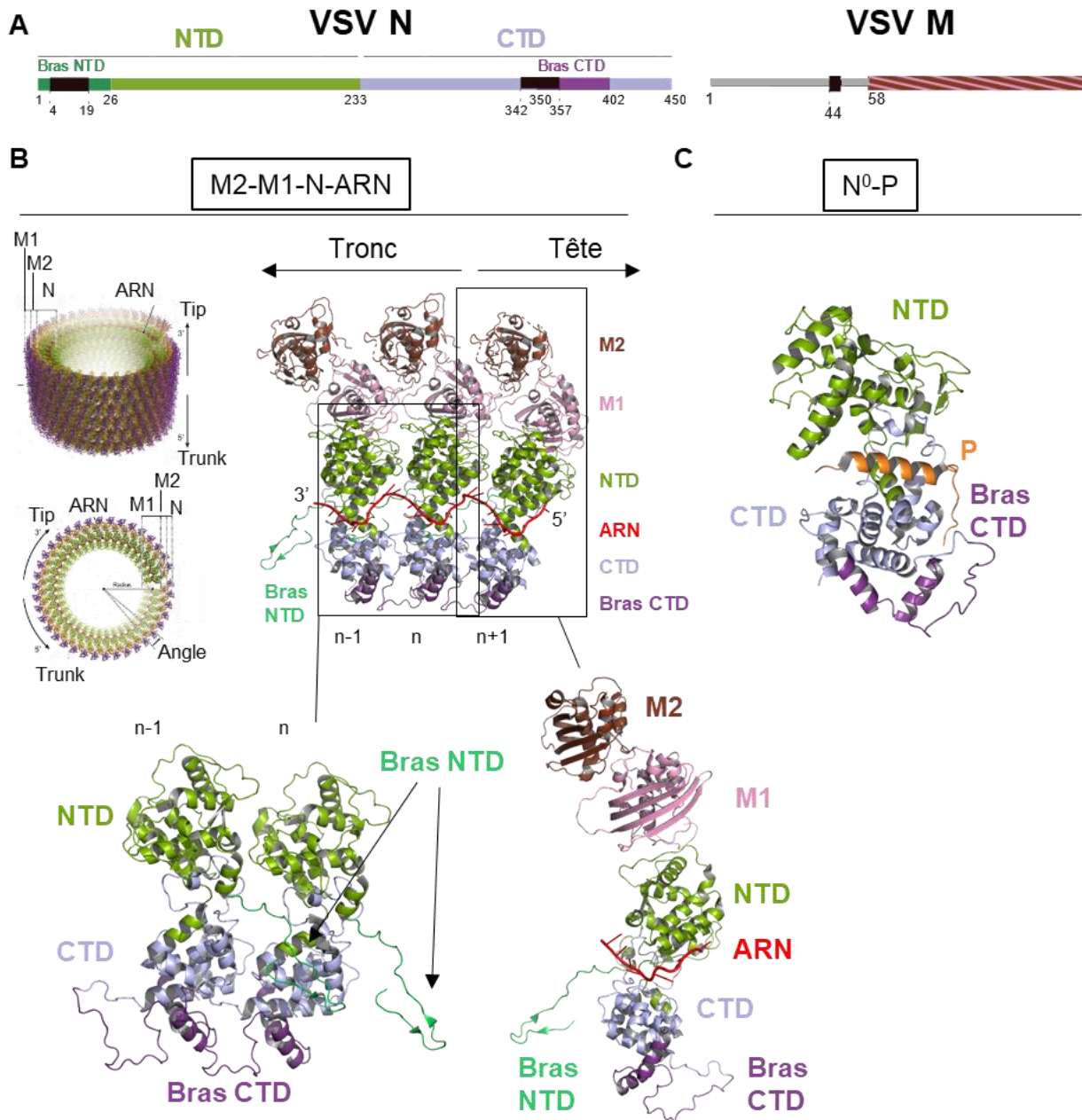
La nucléoprotéine N joue un rôle structural en encapsidant les ARN viraux. Présente avec près de 1200 copies dans le virion de VSV (Thomas et al., 1985), N recouvre l'entièreté du génome viral. La structure cristallographique de la nucléocapside (N liée à des molécules d'ARN) a révélé l'organisation de N en deux domaines structuraux, domaine C-terminal (CTD) et domaine N-terminal (NTD), qui forment un sillon chargé positivement à leur jonction (**Figure 7.A&B**). Les chaînes latérales des acides aminés au niveau de ce sillon établissent des interactions électrostatiques avec les phosphates des 9 bases d'ARN (Green et al., 2006, Albertini et al., 2006) (**Figure 7.B**). Les deux domaines (CTD et NTD) ont des extensions qui s'étendent à l'arrière des protomères voisins pour renforcer et rigidifier la structure N-ARN (**Figure 7.B**).

Lorsqu'elle est surexprimée en l'absence de P, N lie les ARN cellulaires et forme des anneaux et des hélices (Green et al., 2006, Chen et al., 2004, Desfosses et al., 2013, Albertini et al., 2006), voir sous certaines conditions des assemblages hélicoïdaux N-ARN en forme de balles de fusil similaires à ceux observés dans les virions de VSV (Desfosses et al., 2013). Ces assemblages hélicoïdaux reposent sur l'interaction du segment en épingle à cheveux du NTD de N de l'unité  $n-1$  qui s'ancre dans la boucle du CTD de N de l'unité  $n+1$  (**Figure 7.B**). La flexibilité de ces éléments permet les différentes courbures des anneaux de RNP à l'extrémité du virion et le long de son tronc (Zhou et al., 2022) (**Figure 7.B**). La résolution de la structure du virion de VSV par cryo-ET (Pen Ge et al., 2010, Jenni et al., 2022, Zhou et al., 2022) a également permis de décrire l'interface d'interaction entre les unités hélicoïdales de N et les unités de la protéine de matrice M (**Figure 7.A&B**). La nucléoprotéine N interagit également avec la polymérase virale L et son cofacteur P et l'interaction entre ces trois protéines permet la transcription et la réplication du génome virale, dans laquelle la RNP sert de matrice à la polymérase L (Ivanov et al., 2011) (**Figure 8**).

N existe également sous une forme  $N^0$  libre d'ARN et liée à la protéine P (**Figure 7.C**). Le rôle de cet assemblage est présenté en **I-D-3.1.b**.

L'étude par cryo-ET de particules pseudo-virales de RABV révèle une organisation du complexe RNP de RABV légèrement différente de celle de VSV (Riedel et al., 2019). L'hétérogénéité de morphologie des particules produites par RABV et le manque de contact entre les sous-unités de nucléoprotéines N en dehors des bras NTD et CTD supportent l'idée d'un certain degré de liberté des arrangements de N au sein des RNP de RABV (Riedel et al., 2019). L'interface d'interaction entre N et M reste encore mal définie (Riedel et al., 2019) (**Figure 10**).

La nucléocapside N joue un rôle dans l'évasion de la réponse immunitaire. En encapsidant systématiquement l'ARN viral, le complexe N-ARN formé permet de prévenir la dégradation de l'ARN viral par des nucléases cellulaires. RABV N permet aussi d'empêcher la reconnaissance de l'ARN viral par RIG-I et l'activation de la cascade de production d'interférons (Akira et al., 2006, revue dans Blondel et al., 2015, Scrima et al., 2023). N est également le deuxième antigène majeur des Rhabdovirus, qui peut induire une réponse T CD4+ permettant la production d'anticorps neutralisants (Dietzschold et al., 1987).



**Figure 7. Structure et organisation des sous-unités de N et M chez VSV**

(A) Représentations schématiques de l'organisation en domaines la nucléoprotéine N et de la protéine de matrice M. Les zones d'interaction entre N et M sont indiquées par les rectangles noirs sur les schémas. (B) Vue latérale des couches hélicoïdales constituées par la RNP et par M (Extrait de Jenni et al., 2022). 2 molécules de N interagissent au niveau du bras flexible du NTD<sub>n-1</sub> qui vient interagir au



niveau du CTD N, tandis que le bras flexible du CTD<sub>n</sub> interagit avec le CTD<sub>n-1</sub> (gauche). N encapside 9 nucléotides d'ARN viral et interagit avec la 1<sup>ère</sup> couche de protéine de matrice M (M1) au niveau de son NTD (droite) (PDB : 7uws). **(C)** Organisation du complexe N<sup>0</sup>-P en l'absence d'ARN cible (PDB : 3pmk).

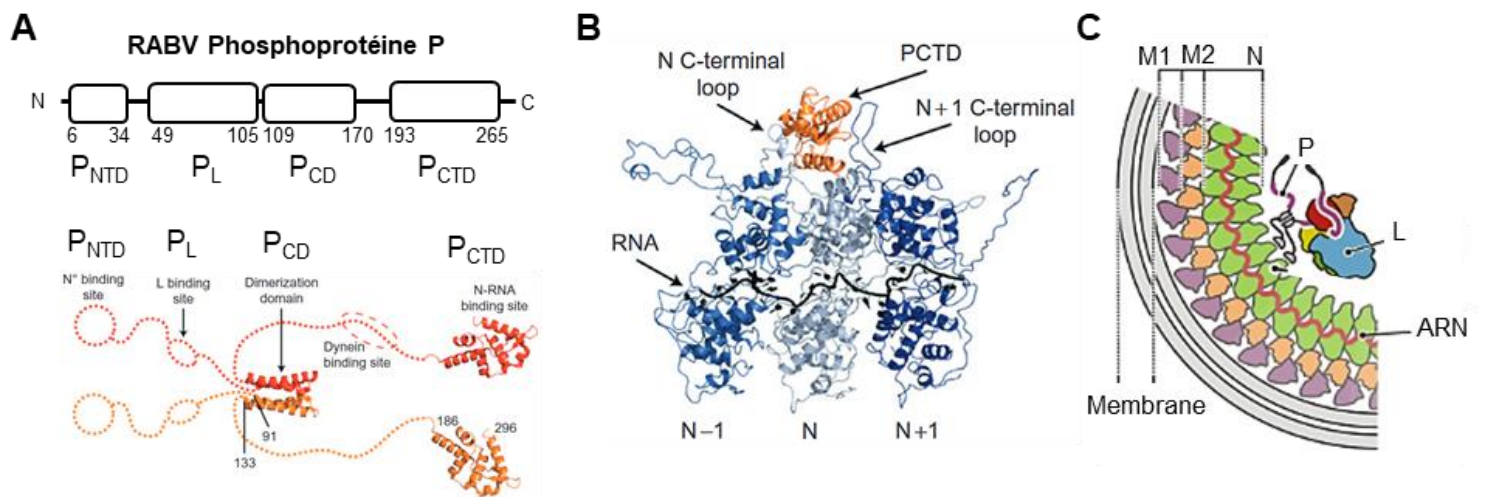
### **b. La phosphoprotéine P**

La phosphoprotéine P est une protéine structurale multifonctionnelle. En fonction de sa localisation (virion ou cellules infectées), P présente des niveaux de phosphorylation différents (Barik et Banerjee, 1992, Chen et al., 1997). P existe sous plusieurs isoformes dans les cellules infectées : l'isoforme P1 de pleine longueur et les isoformes P2 à P5 progressivement tronquées en N-terminal, générées par *leaky scanning* ribosomal (Chenik et al., 1995).

P intervient dans les étapes de traduction et répllication du génome viral : elle est le cofacteur non catalytique de la polymérase virale L et agit comme chaperonne permettant l'assemblage d'unité de nucléoprotéines néo-synthétisée N<sup>0</sup> à l'ARN viral. La phosphoprotéine P des Rhabdovirus contient trois domaines structuraux séparés les uns des autres par deux domaines intrinsèquement désordonnés (Gérard et al., 2009, Leyrat et al., 2011) (**Figure 8.A**). Les domaines structuraux de P sont les suivants : le domaine N terminal qui interagit avec N<sup>0</sup>, le domaine central de dimérisation et le domaine C terminal qui interagit avec la forme N-ARN associée à l'ARN viral (Ding et al., 2006) (**Figure 7.C, Figure 8.B&C**).

P est le cofacteur de la polymérase virale L. Les résidus 65-175 du domaine de dimérisation de RABV P sont indispensables à l'activité de transcription (Jacob et al., 2001). Les résidus 11-50, portés par le domaine C terminal de RABV P, sont impliqués dans la régulation de l'activité de la polymérase L (Morin et al., 2016). Deux autres régions de RABV P sont proposées pour permettre l'interaction de P avec L (résidus 1-19 et 40-100) (Castel et al., 2009, Chenik et al., 1998).

P joue également le rôle de chaperonne en contrôlant l'association des nucléoprotéines néosynthétisées (N<sup>0</sup>) à l'ARN viral (voir **I-D-3.1.a**). Le complexe formé N<sup>0</sup>P chez VSV est présenté en **Figure 7.C** et **Figure 8.B**. Chez RABV, la liaison de P à N<sup>0</sup> est médiée par une transition structurale du domaine désordonné N terminal de P vers une hélice alpha (motif MoRE) (Gérard et al., 2022) (**Figure 7.C, Figure 8.B**). Chaque dimère de P peut prendre en charge deux unités de N<sup>0</sup> indépendamment l'une de l'autre (Gérard et al., 2022). P et le bras NTD de la protéine N adjacente contrôlent l'état d'ouverture ou de fermeture de N (Gérard et al., 2022). Par ailleurs, la résolution du complexe N<sup>0</sup>-P de ABLV a montré que l'interface d'interaction entre ces deux protéines est conservée au moins au sein du phylogroupe I (Donnelly et al., 2023).



**Figure 8. Organisation de la phosphoprotéine P des Rhabdovirus**

**(A)** Organisation schématique de la phosphoprotéine P du VSV (haut), structure cristallographique des domaines structurés de VSV P (bas). (Extrait de Albertini et al., 2011) **(B)** Structure du complexe N-ARN-P de RABV (PDB : 1vvi). (Extrait de Albertini et al., 2011) **(C)** Positionnement de P au sein du virion de VSV. (Extrait de Jenni et al., 2022)

RABV P est capable de former des organelles liquides par séparation de phase liquide-liquide *in vitro* et *in vivo* (Nevers et al. 2022). Les domaines de dimérisation, le domaine C terminal et le domaine intrinsèquement désordonnée les reliant sont requis pour la transition de phase liquide-liquide (Nikolic et al., 2017, Nevers et al., 2022).

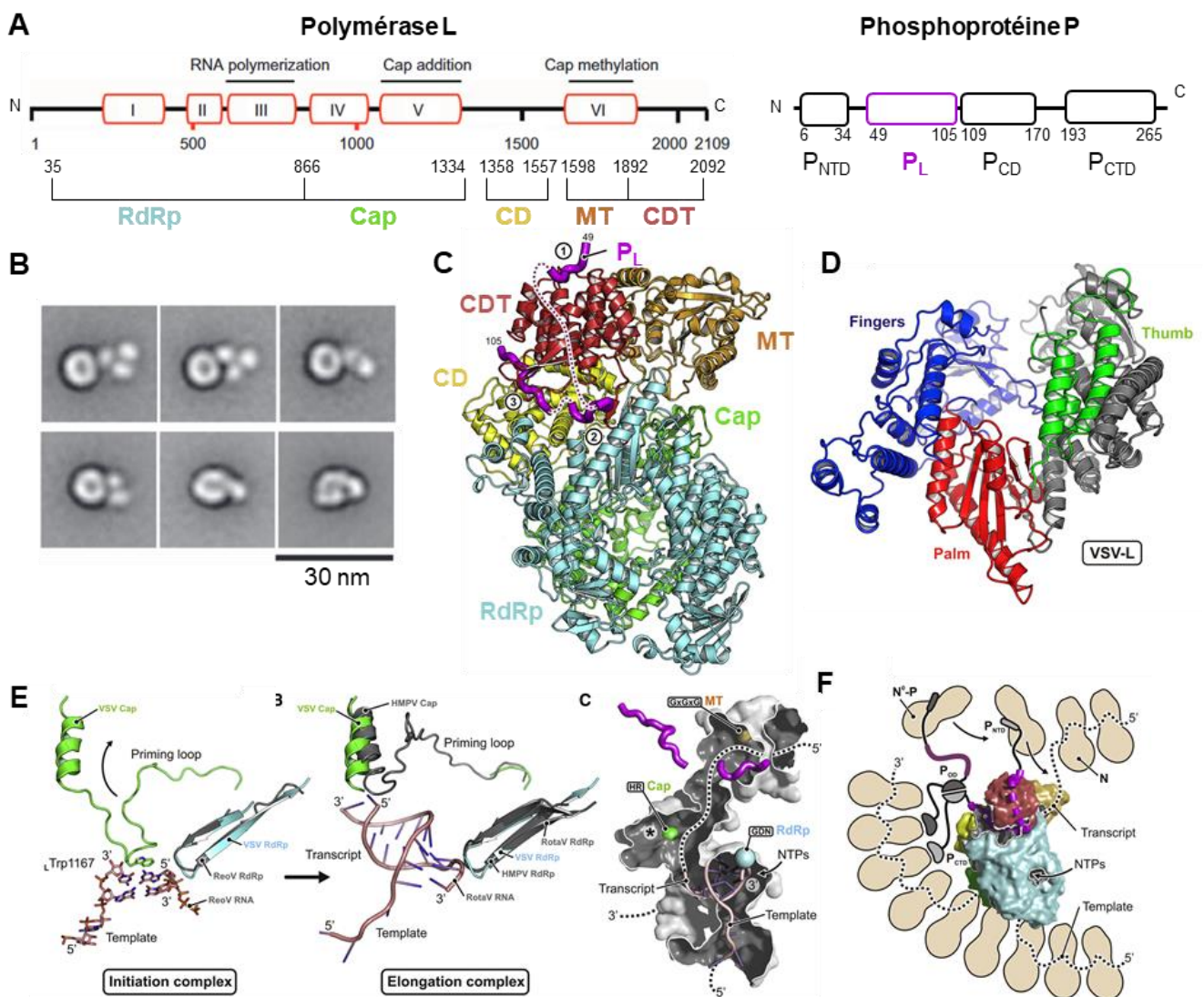
P joue également un rôle important dans l'évasion de la réponse immunitaire. Il est montré que dans le cas de RABV, P est le principal élément viral qui contrecarre la réponse immunitaire innée (Chelbi-Alix et al., 2006, Ito et al., 2010).

### c. L'ARN polymérase ARN-dépendante

La polymérase L des Rhabdovirus est la sous-unité catalytique du complexe polymérase viral L-P nécessaire à la transcription et à la réplication virales. L catalyse l'ajout de nucléotides à la chaîne néosynthétisée d'ARN viral (activité RdRp RNA dependante RNA polymerase) ainsi que l'ajout et la méthylation de la coiffe de l'ARNm viral (Ogino & Banerjee, 2007, Sleat & Banerjee, 1993). La polymérase L, de 250 kDa, est organisée en six régions conservée (appelées CR I-VI) au sein des virus à ARN simple brin non segmenté de polarité négative (Poch et al., 1990) (**Figure 9.A**). L'activité RdRp est portée par la région CRIII (Sleat & Banerjee, 1993) (**Figure 9.B**). L'activité de coiffe de l'ARNm viral est portée par la région CRV (Li et al., 2005) et l'activité méthyltransférase par la région CRIV (Li et al., 2008).

La région RdRp de VSV L révèle une homologie structurale avec et les régions enzymatiques correspondantes des polymérases des virus à ADN double brin (Liang et al., 2015) : en effet, le domaine RdRp est organisé en motif « doigt-paume-pouce » (**Figure 9.C&D**).

Les premières images de cryo-EM ont révélées que la liaison de P à L provoque un changement de conformation sur L, nécessaire à son activité, qui reflèterait un positionnement optimal des domaines de la polymérase pour la synthèse d'ARN (Rahmeh et al., 2010, Morin et al., 2017). Effectivement, P, à travers son interaction avec plusieurs domaines de L, bloque cette dernière dans un état fermé et compact compétent pour l'initiation (Liang et al., 2015, Jenni et al., 2020) (**Figure 9.E&F**). Le contact de trois segments de P avec L entraîne un repositionnement du domaine N terminal de la polymérase au contact d'un canal putatif de sortie de l'ARN (Jenni et al., 2020), ce qui permettrait une encapsidation efficace par N<sup>0</sup> des génomes viraux néo-synthétisés (Jenni et al., 2020) (**Figure 9.E&F**). L'interaction de P avec L réoriente également son domaine C-terminal de façon à ce qu'il interagisse avec la matrice d'ARN (Jenni et al., 2020) : une boucle du domaine CR V (résidus 1157-1173) s'insère au niveau du site catalytique du domaine RdRp où elle semble jouer le rôle d'une boucle de *priming* : le résidu Trp165, conservé chez les Vésiculovirus, permet de stabiliser le nucléotide initiateur (Liang et al., 2015) (**Figure 9.E**).



### Figure 9. La polymérase L des Vésiculovirus

**(A)** Organisation en domaine de la polymérase L (gauche) et de la phosphoprotéine P (droite) de VSV. **(B)** Caractérisation par ME de l'organisation de VSV L mettant en évidence la structure en anneau de RdRp et les domaines trois domaines globulaires (CAP, CD et MT). (Extrait de Rahmeh et al., 2010) **(C)** Structure cryo-EM du complexe L-P<sub>35-106</sub>. Les régions flexibles de P, en pointillés, relient trois segments de P à L (PDB : 6u1x). **(D)** Structure du domaine RdRp en « main-doigt-pouce » (PDB : 5a22). (Extrait de Liang et al., 2015). **(E) Modèle du complexe d'initiation (gauche)** : la 1<sup>ère</sup> liaison phosphodiester du transcrite est formée entre les nucléotides en position de priming et le nucléotide suivant. Trp1167 de la boucle de priming stabilise le nucléotide d'amorçage. **Modèle du complexe d'élongation (milieu)** : pour permettre le glissement du duplexe ARN matrice-transcrit, la boucle de *priming* pourrait se rétracter de façon similaire à ce qui est observé dans la L du HPMV (PDB : 6U50). **Positionnement de l'ARN dans le complexe VSV L-P (droite)** : la rétractation de la boucle de *priming* dans l'espace entre les domaines Cap et CD (\*) permet l'ouverture d'un chemin continu pour l'ARN transcrite. La matrice d'ARN rentre par le bas et sort à l'arrière, en bas à gauche. Les nucléotides substrats rentrent latéralement (flèche) dans le site catalytique (Extrait de Jenni et al., 2020). **(F) Modèle de réplication** : au cours de la synthèse d'ARN, au moins 3 molécules de N doivent se dissocier de la matrice d'ARN, ce qui permet l'insertion de cette dernière dans le site catalytique du domaine RdRp de L. Elles se réassocient par la suite (Albertini et al., 2006, Green et al., 2006). La liaison de P à L stabilise la conformation fermée de L, conduit à une polymérisation active et repositionne son domaine N-terminal (P<sub>NTD</sub>) près du canal de sortie de l'ARN transcrite. Ce repositionnement de P facilite le transfert de l'ARN émergent de N à N<sup>0</sup>-P. Le domaine C-terminal de P (P<sub>CTD</sub>) interagit avec la RNP ; il peut guider la polymérase le long de la matrice. La dimérisation de P par le biais du domaine d'oligomérisation (P<sub>OD</sub>) conduirait à des interactions supplémentaires avec la RNP et N<sup>0</sup>-P. **(C, E, F** : extraits de Jenni et al., 2020).

## 3.2. Les protéines de l'enveloppe virale

### a. La protéine de matrice M

La protéine de matrice M, 20-25 kDa, est la protéine la plus abondante des virions (1800 copies, Thomas et al., 1985). M est elle aussi multifonctionnelle : elle joue un rôle critique dans l'étape d'assemblage des nouvelles particules virales (Chong et al., 1994), la régulation de la transcription et la réplication du génome viral (Connor et al., 2006, Finke et al., 2003), la régulation de la machinerie de transcription et traduction de la cellule hôte (Whitlow et al., 2006, 2008, Gaddy et al., 2005, Redondo et al., 2015) et l'évasion à la réponse immunitaire (Connor et al., 2006, Finke et al., 2003, Blondel et al., 2015).

Malgré le faible pourcentage d'identité de séquence de M au sein des Rhabdovirus, la structure de la protéine M de VSV New Jersey (Gaudier et al., 2002, Graham et al., 2008) et du virus Lagos Bat (Lyssavirus du phylogroupe II) (Graham et al., 2008) sont remarquablement similaires (pour seulement 10% d'identité de séquence) (**Figure 10.B&C**). M est organisée en deux domaines : une extrémité-N terminale flexible et un domaine C-terminal globulaire (Gaudier et al., 2002, Graham et al., 2008) (**Figure 10.A**).

Le domaine globulaire C-terminal de M possède un sillon hydrophobe impliqué dans l'oligomérisation de M. C'est dans ce sillon que vient se positionner le segment désordonné (DNT) du protomère adjacent de M (Graham et al., 2008, Assenberg et al., 2010).

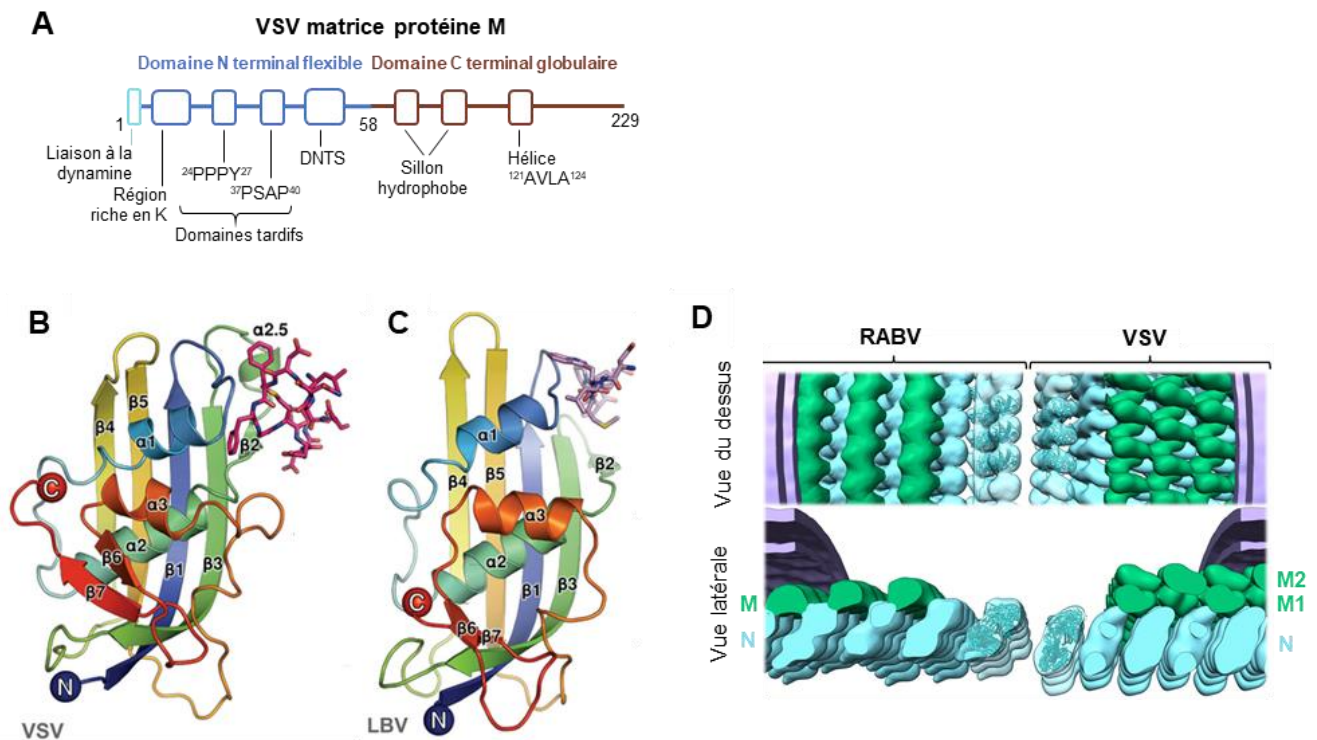
Le domaine N-terminal flexible de M contient une région riche en lysines, des motifs riches en proline dits motifs tardifs, <sup>24</sup>PPPY<sup>27</sup> et <sup>37</sup>PSAP<sup>40</sup>, et le DNT (**Figure 10.A**). Chez VSV M, la région riche en lysine et la boucle hydrophobe <sup>121</sup>AVLA<sup>124</sup> (du domaine C terminal) interagissent avec les membranes chargées négativement (Solon et al., 2005, Gaudier et al., 2002). Le motif PSAP permet l'interaction avec TSG101, un composant de la machinerie ESCRT impliquée dans les événements de bourgeonnement (Bieniasz, 2006). Les motifs PPxP peuvent interagir avec les domaines WW de Nedd4, une E3 ubiquitine ligase (Harty et al., 1999, Timmins et al., 2003), qui est impliquée entre autre dans le bourgeonnement de plusieurs rétrovirus ( ) et du virus Ebola (Harty et al., 2000). Ces deux motifs (PPxP et PSAP) sont responsables du recrutement de la machinerie de la cellule hôte nécessaire à l'étape de bourgeonnement des particules virales (Jayakar et al., 2000, Irie et al., 2004, Obiang et al., 2012).

M possède également un site de liaison à la dynamine (**Figure 10.A**). L'interaction avec cette dernière perturbe l'endocytose CME et semble nécessaire pour l'assemblage des particules virales. En effet, l'abolition de l'interaction entre M et la dynamine impacte négativement la colocalisation de G et N, ce qui conduit à des assemblages et des événements de bourgeonnement défectueux (Raux et al., 2010).

Une des fonctions premières de M est de permettre le bourgeonnement des virus au niveau de la membrane plasmique. Les virions matures de VSV présentent deux couches de M, la couche M1 et la couche M2, composées toutes les deux par la même protéine M mais qui présente une orientation différente entre les deux couches (rotation de 40°) (**Figure 7, Figure 10**) qui pourrait être une résultante de la double fonction de M dans l'assemblage des virions de VSV (Zhou et al., 2022). La couche M1 présente une interface hydrophile et correspondrait à la forme cytosolique de M qui interagirait avec la nucléocapside (Gaudin et al., 1995, Flood et al., 1999, Lyles & McKenzie, 1998) et aiderait à la condenser, bien que ce rôle pour M soit remis en question (Desfosses et al., 2013). La couche M2 correspondrait à la M ségrégée dans des microdomaines membranaires en dehors des sites de bourgeonnement (Swinteck et Lyles, 2008) (**Figure 10**). Du fait de son orientation au sein des particules virales, la couche M2 présente une interface plus hydrophobe avec des motifs <sup>195</sup>PKYQS<sup>199</sup> et <sup>216</sup>ATG<sup>218</sup> tournés vers la membrane ainsi que des résidus chargés négativement qui pourraient interagir avec le domaine intraviral de G, riche quant à lui en acides aminés chargés positivement (Zhou et al., 2022). Cette couche M2 permettrait également le recrutement des nucléocapsides condensées par la couche de M1 (Zhou et al., 2022), ce qui est supporté par la colocalisation de ces microdomaines avec des régions cytosoliques dans lesquelles les nucléocapsides s'accumulent (McCreedy et al., 1989, Ohno et

al., 1987, Swintek et Lyles, 2008). Le mécanisme de recrutement de ces RNP reste encore mal connu. La couche M2 assurerait ainsi la liaison entre les nucléocapsides liées à M1 et G à la surface du virion (Zhou et al., 2022).

L'organisation différente de M à l'intérieur des virions de RABV, en monocouche (**Figure 10.C**), suggère un mécanisme de bourgeonnement légèrement différent, mais encore non élucidé (Riedel et al., 2019).



**Figure 10. Organisation de la protéine de matrice M de VSV**

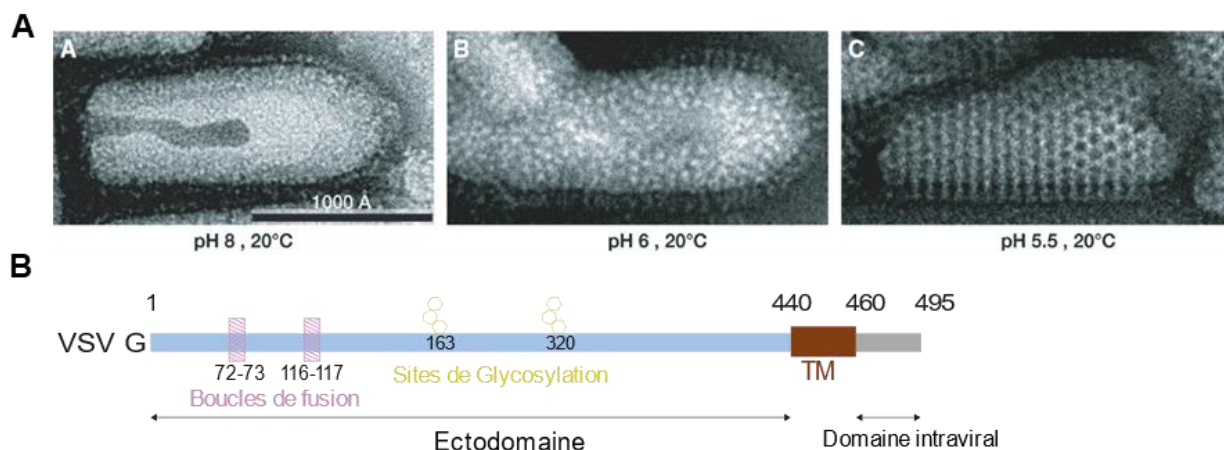
(A) Représentation schématique de l'organisation de la protéine de matrice M de VSV. Les boîtes indiquent les motifs remarquables de M. (B&C) Structure cristallographique de VSV M (résidus 58-229, B) et LBV M (résidus 48-202, C). Les résidus de la partie N-terminale de M qui interagissent avec le domaine globulaire du protomère de M adjacent sont représentés en bâtonnets (PBD : 2w2r, 2w2s). (Extraits de Stephen et al., 2008) (D) Positionnement de M par rapport à la nucléocapside virale, en bicouche au sein du virion de VSV, et en monocouche au sein du virion de RABV. (Extrait de Riedel et al., 2019)

### b. La glycoprotéine G

La glycoprotéine des Rhabdovirus est une protéine transmembranaire de type I. Après clivage du signal peptide, G est constituée d'environ 500 acides aminés (495 pour VSV G, 505 pour RABV G). Il existe une importante variation entre les glycoprotéines des Lyssavirus au niveau des séquences d'acides nucléiques (jusqu'à 50%) et en acides aminés (jusqu'à 64%) (Evans et al., 2012). G constitue les spicules visibles à la surface des particules virales (Gaudin et al., 1992, Peng Ge et al., 2010, Libersou

et al., 2010). G existe sous différentes formes à la surface des particules virales, ceci est discuté en **II.C-6 (Figure 11.A)**.

L'organisation spatiale de la glycoprotéine est bien conservée au sein des genres *Lyssavirus* et *Vésiculovirus* (voir **II-B-iii (Figure 11)**). G est ancrée dans la membrane virale par une hélice  $\alpha$  transmembranaire d'une 20<sup>aine</sup> d'acides aminés proche de l'extrémité C-terminale de la protéine (**Figure 11.B**). La majeure partie de G se situe ainsi à l'extérieur de la particule virale et constitue son ectodomaine (452 acides aminés pour VSV, 440 pour RABV) (**Figure 11.B**). L'ectodomaine de *Rhabdovirus* G est la cible principale des anticorps neutralisants. Cette propriété sera discutée en **III**. La partie intravirale, courte (35 aa pour VSV, 44 aa pour RABV), est supposée interagir entre autres avec la protéine de matrice M (Ge et al., 2010). Certaines souches de RABV, à la différence des autres G de *Lyssavirus*, présentent sur la partie intravirale (ICD) un motif PMB (de liaison au PDZ) (revu dans Caillet-Saguy et al., 2015). En particulier, une mutation critique de la dernière glutamine du PMB (Q486E) affecte fortement la nature des interactants neuronaux de G et est directement liée au caractère virulent ou atténuée des souches du virus de la rage (Caillet-Saguy et al., 2015). La structure de la G des *Rhabdovirus* est présentée en **II.C**.



**Figure 11. Organisation de la glycoprotéine G de VSV**

**(A)** Organisation de G à la surface des particules de VSV à pH 8, pour lequel G est sous forme pré-fusion, à pH 6,6 pour lequel G adopte une conformation allongée monomérique et à pH 5,5, pour lequel G est sous forme trimérique post-fusion. Les images présentées sont des micrographies de coloration négative. (Extrait de Baquero et al., 2017) **(B)** Représentation schématique de l'organisation de la glycoprotéine G de VSV. En bleu, son ectodomaine, en marron, son domaine transmembranaire (TMD) et en gris sont domaine intraviral (ICD).

Contrairement aux autres protéines virales synthétisées dans le cytoplasme, G est transloquée dans le réticulum endoplasmique (RE), où elle est concentrée dans des vésicules associées au RE avant d'être transportée dans le réseau trans-golgien (TGN) (Black et al., 1994) puis ségrégée aux niveaux de microdomaines dans la membrane plasmique, probablement au sein de radeaux lipidiques (Préhaud et al., 2003).

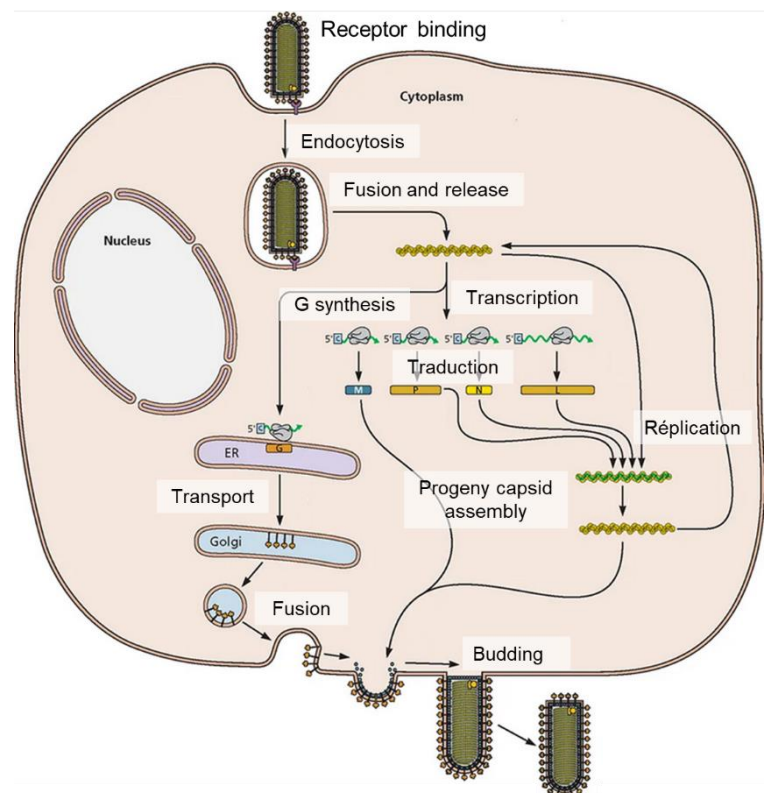
L'ectodomaine des glycoprotéines des Rhabdovirus est N-glycosylé (**Figure 11**). Le nombre de sites de glycosylation peut varier d'une glycoprotéine à une autre. VSV G et RABV G contiennent respectivement deux et trois sites de glycosylation. Ces N-glycosylations sont indispensables au bon repliement de la protéine et son transport dans les vésicules d'exocytose. Elles permettent d'augmenter la solubilité des intermédiaires de repliements ainsi que l'interaction de G avec la calnexine, une protéine chaperonne avec des propriétés de lectine (Gaudin, 1997, Hammond et Helenius, 1994, Mathieu et al. 1996). Cette protéine chaperonne aide la glycoprotéine au cours de son repliement en empêchant les interactions hydrophobes inappropriées des boucles de fusion portées par G (ces boucles sont présentées en **II-C-4**) (Mendoza et al., 1991). RABV G possède également un site de palmytoylation au niveau de la jonction entre le domaine transmembranaire et l'extrémité cytosolique de G (Gaudin et al., 1991).

Compte tenu de l'objectif de cette thèse, les propriétés de la glycoprotéine G des Vésiculovirus et des Lyssavirus sont développées plus en détail en **II**.

## **E. Cycle viral des Rhabdovirus**

### **1- Présentation du cycle viral**

Le mécanisme de réplication des Rhabdovirus est très conservé au sein de la famille (Dietzgen et al., 2017) et se déroule en cinq étapes : (i) l'entrée dans la cellule cible reposant sur la liaison au récepteur cellulaire suivi de l'étape d'endocytose médiée par la clathrine (CME), (ii) la fusion de membrane de la particule virale et de la membrane endosomale libérant le complexe RNP dans le cytoplasme des cellules infectées, (iii) la transcription et traduction du matériel viral, (iv) la réplication du génome viral et son encapsidation, (v) l'assemblage des nouvelles particules virales et leur relargage dans le milieu extracellulaire. Les étapes du cycle de réplication sont entièrement cytoplasmiques pour les genres Vésiculovirus et Lyssavirus (**Figure 12**).



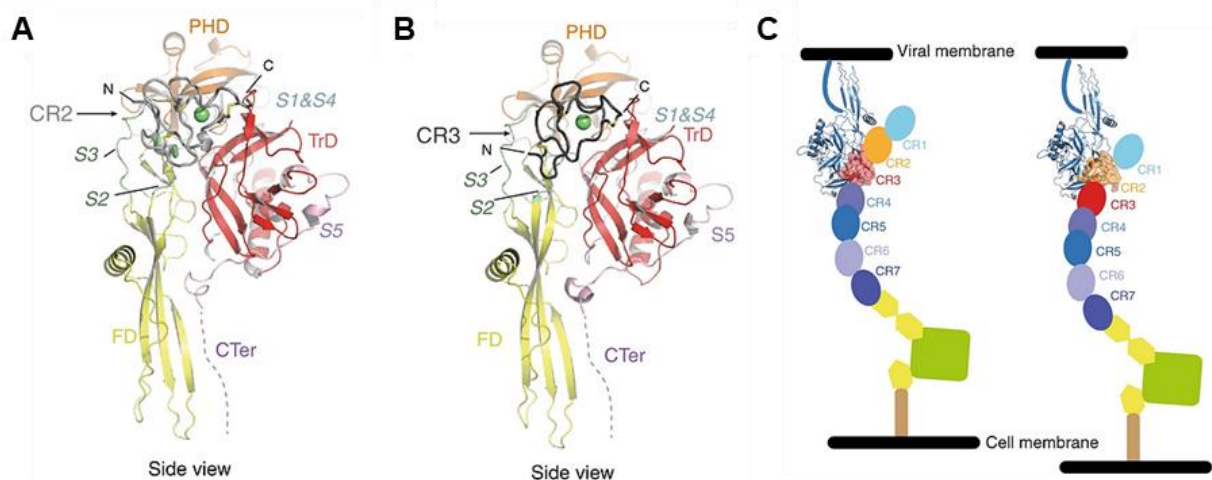
**Figure 12. Cycle viral des Rhabdovirus**



Le propos de cette thèse portant sur la glycoprotéine des Vésiculovirus et des Lyssavirus, seules les étapes d'entrée seront commentées par la suite. En effet, c'est la glycoprotéine G qui est impliquée dans les étapes précoces du cycle viral.

## 2- Reconnaissance et liaison au récepteur cellulaire

VSV présente un spectre d'hôtes diversifié et un tropisme cellulaire important qui s'explique par le caractère ubiquitaire de son récepteur cellulaire. Effectivement, VSV a pour récepteur principal le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR), tandis que d'autres membres de la famille des récepteurs des LDL peuvent aussi jouer le rôle de récepteurs alternatifs (Finkelshtein et al., 2013). Le LDLR présente un ectodomaine comportant notamment une répétition de domaines riches en cystéines, dits CR1-7 (**Figure 13.A&B**). Des expériences de liaison de G à ces différents CR domaines ont montré que G peut lier distinctement CR2 et CR3 chez le LDLR (**Figure 13.A&B**). La résolution des complexes G-CR2 et G-CR3 par cristallographie a permis d'identifier les résidus impliqués dans l'interaction entre VSV G et le LDLR (**Figure 13.C**). Ce travail a aussi montré que les activités de reconnaissance du récepteur cellulaire et de fusion portées par la glycoprotéine G de VSV peuvent être découplées (voir II-C) (Nikolic et al., 2018). Concernant les autres Vésiculovirus, aucun récepteur n'est encore identifié.



**Figure 13. Structures de VSV G en complexe avec le récepteur LDLR**

Extraits de Nikolic et al., 2018. **(A&B)** Vues de côtés des complexes G-CR2 et G-CR3. **(C)** Schéma de l'interaction entre G et le LDLR.

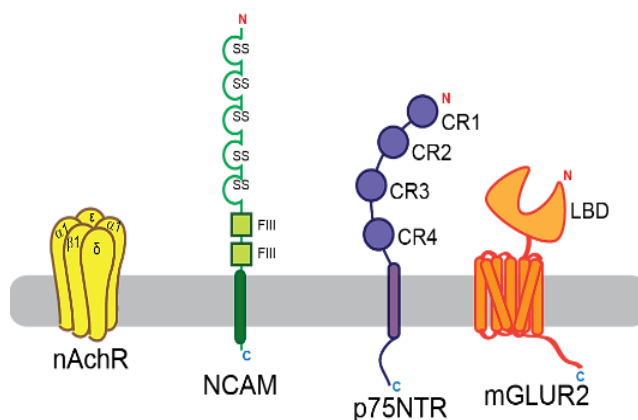
Lgr4, le récepteur 4 couplé à la protéine G contenant des répétitions riches en leucine, est proposé comme récepteur alternatif au LDLR (Zhang et al., 2017). En effet, il semble essentiel à l'infection par VSV et des pseudotypes présentant VSV G à leur surface (Zhang et al., 2017). Cependant, plusieurs éléments viennent remettre en cause cette proposition (discutés dans Rubinstein, 2018) : (i) la délétion de Lgr4 au niveau cellulaire impacte surtout l'infection par VSV de macrophages

péritonéaux, qui ne sont pas les cellules habituellement infectées par VSV (Zhang et al., 2017), (ii) dans l'étude menée par Zhang et al., 2017, les ectodomaines de VSV et Lgr4 sont exprimés sans peptide signal, ce qui laisse penser que ces protéines peuvent être mal repliées et agrégées suite à une absence de translocation dans le réticulum endoplasmique, (iii) l'affinité de Lgr4 pour VSV G est moindre ( $K_D=69,05$  nM) comparée à celle de VSV G pour le LDLR ( $K_D=10$  nM) dans les mêmes conditions (VSV G fixée) (Rubinstein, 2018, Zhang et al., 2017, Finkelshtein et al., 2013), (iv) les résultats de biacore sont discutables puisqu'aucune dissociation n'est observée (Zhang et al., 2017). Le rôle de récepteur de Lgr4 reste donc encore à prouver.

Plusieurs récepteurs pour RABV sont proposés à ce jour (**Figure 14**) :

- (i) le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) (Lentz et al., 1986), seul récepteur proposé pour lequel il n'existe aucune preuve directe chez les modèles animaux de sa fonction de récepteur pour RABV,
- (ii) la molécule d'adhésion des cellules neuronales (NCAM) dont la pré-incubation de la forme soluble (ectodomaine) avec RABV inhibe l'infection de cellules susceptibles (Thoulouze et al., 1998),
- (iii) le récepteur de faible affinité aux neurotrophines (p75NTR) qui est un ligand de l'ectodomaine de la glycoprotéine de RABV (Tuffereau, 1998),
- (iv) le récepteur métabotrope du glutamate 2 (mGluR2) qui a été identifié par screen RNAi comme nécessaire à l'infection de neurones par le RABV (Wang et al., 2018).

Bien que des études approfondies aient été menées pour identifier les récepteurs du RABV, les données disponibles suggèrent l'existence de récepteurs non identifiés (Belot et al., 2019). Rien n'est actuellement connu concernant l'identité des récepteurs des autres Lyssavirus.



**Figure 14. Récepteurs proposés de RABV**

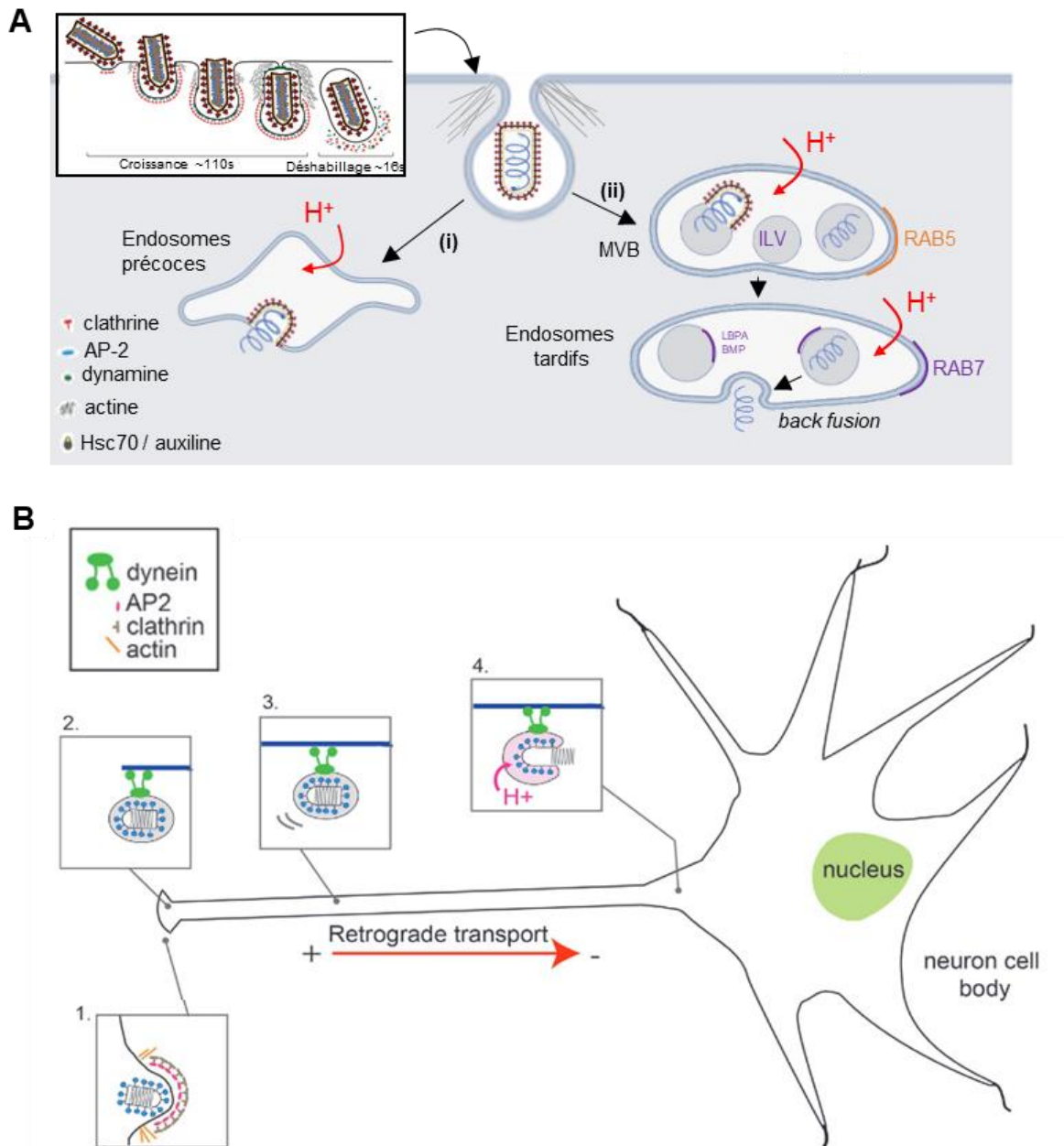
Adapté de Belot et al., 2019. nAChR est composé de cinq sous-unités disposées autour d'un pore central. L'ectodomaine de NCAM est composé de cinq domaines de type immunoglobuline (Ig) suivi de deux domaines de fibronectine de type III (FIII). L'ectodomaine de p75NTR est composé de cinq domaines riches en cystéines (CR). mGluR2 est une protéine transmembranaire à sept passages (GPCR), son ectodomaine est impliqué dans la liaison du glutamate.

### 3- Endocytose et fusion membranaire

VSV et RABV sont internalisés par endocytose médiée par la clathrine (CME) (Cureton et al., 2009, Piccinotti et al., 2013, Piccinotti et Whelan, 2016). Cette endocytose est dépendante de la dynamine (Johannsdottir et al., 2009, Picconitti et al., 2013), bien que la présence de l'adaptateur AP-2 ne soit pas nécessaire à l'infection (Johannsdottir et al., 2009, Picconitti et al., 2013).

L'endocytose des particules virales de VSV est dépendante de l'actine au niveau des sites d'internalisation de VSV pour achever le processus d'internalisation du fait de la taille supérieure des particules de VSV (~75-200nm) par rapport à la taille moyenne d'une vésicule de CME (60nm) (Cureton et al., 2009, 2010) (**Figure 15.A**). Après endocytose de VSV par CME, une étape de fusion membranaire entre la membrane virale et la membrane de l'endosome, médiée par G, est nécessaire au relargage de la RNP dans le cytoplasme des cellules. Cette étape survient 1 à 2 minutes après l'internalisation du virion (Johannsdottir et al., 2009). L'environnement dans lequel la fusion médiée par G se produit fait débat. Deux modèles sont actuellement proposés, et présentés en **Figure 15.A**.

Dans le cas de RABV, il semble que de façon prédominante, le virion internalisé est transporté encore entier à l'intérieur de la vésicule d'endocytose jusqu'au corps des neurones (Mazarakis et al., 2001, Klingen et al., 2008, Gluska et al., 2014, Piccinotti et Whelan, 2016). Néanmoins, le site exact d'acidification des endosomes reste un sujet à débat (Belot et al., 2019) (**Figure 15.B**).



**Figure 15. Voies proposées pour l'entrée de VSV dans la cellule hôte**

**(A)** Encart : modèle d'internalisation de VSV par CME dépendante de l'actine (Extrait de Cureton et al., 2009). Deux voies d'entrées de VSV sont proposées : (i) l'étape de fusion médiée par G a lieu dans les endosomes précoces (Johannsdottir et al., 2009, Mire et al., 2010, Siczarski and Whittaker, 2003) ; (ii) la fusion se déroule en deux étapes, d'abord dans les MVB, puis dans les endosomes tardifs par *back fusion* qui libère la RNP dans le cytosol des cellules infectées (Le Blanc et al., 2005, Luyet et al., 2008). **(B)** Transport rétrograde de la particule entière de RABV le long de l'axone du neurone infecté. (1) La liaison au récepteur neuronale déclenche l'internalisation du virion par CME, le transport de la vésicule d'endocytose se fait en exploitant le réseau de microtubules (2) jusqu'au corps des neurones (3) où l'acidification de l'endosome induit la fusion des membranes virales et endocytiques (4) permettant le relargage du génome viral dans le cytosol des neurones. (Adapté de Belot et al., 2019)

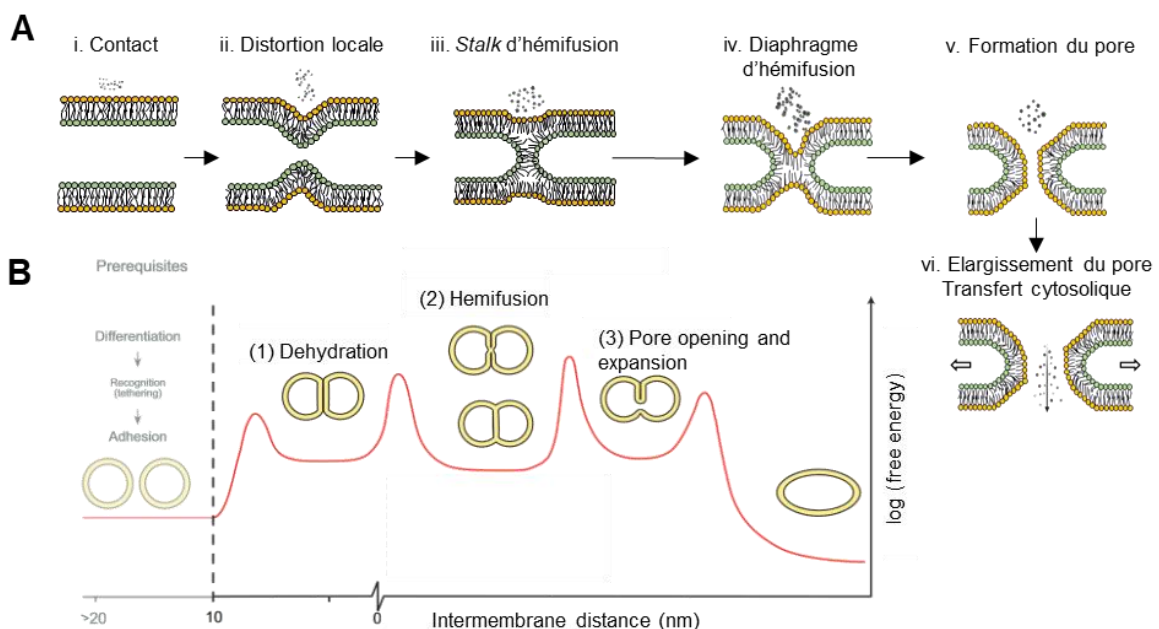
Le rôle précis joué par la glycoprotéine G des Vésiculovirus et Lyssavirus dans le processus de fusion membranaire est décrit en II.

## II. La machinerie de fusion virale

### A. La fusion membranaire

Pour fusionner, deux membranes lipidiques doivent surmonter une barrière énergétique d'environ 40 kcal/mol (Lee and Lentz, 1998, Kuzmin et al., 2001). Cette barrière est la résultante de forces répulsives dues à l'hydratation des têtes polaires lipidiques des membranes. Ces forces répulsives augmentent fortement lorsque la distance entre les deux membranes tombe en-dessous de 20 Å (Parsegian et al., 1979, Rand et Parsegian., 1984). Ceci empêche la fusion spontanée des membranes et préserve l'intégrité des cellules. Une source d'énergie externe est nécessaire pour rapprocher les membranes en dessous d'une distance de 20 Å et initier le processus de fusion membranaire (Chernomordik et al., 2008).

Le modèle de fusion membranaire le plus communément accepté est le modèle « *stalk-pore* » qui repose sur trois étapes clés (Markin et al., 1984) : (1) le rapprochement des membranes entraîne une déformation locale en forme de pointe (i.-ii. **Figure 16.A**), induisant (2) la formation du *stalk* d'hémifusion (iii. **Figure 16.A**), dont l'expansion radiale permet la formation du diaphragme d'hémifusion, (iv. **Figure 16.A**), (3) la formation suivie de l'élargissement d'un pore de fusion entre les deux bicouches lipidiques qui permet le mélange entre les contenus (v.-vi. **Figure 16**).



**Figure 16. Modèle de fusion membranaire par hémifusion**

(A) Modèle de fusion membranaire. (Adapté de Chernomordik et al., 2008) (B) Schéma illustrant les changements d'énergie libre lors de la fusion de deux bicouches. La fusion membranaire a lieu lorsque les deux membranes lipidiques sont à moins de 10 nm l'une de l'autre. L'étape de déshydratation correspond à l'étape de formation du pédoncule (A-ii). La courbe rouge représente l'énergie nécessaire à la fusion membranaire, les quatre pics correspondant aux quatre barrières énergétiques que les protéines fusogènes doivent permettre de franchir. (Adapté de Hernandez et Podbilewicz, 2017)

## **B. Les protéines de fusion virales**

### **1- Généralités**

Afin d'initier un cycle viral productif, le transfert du matériel génétique viral à travers la membrane lipidique des cellules cibles est nécessaire. Ce transfert repose sur une étape de fusion membranaire entre la membrane virale et la membrane des cellules cibles, ce qui permet le relargage du matériel génétique viral dans le cytoplasme des cellules infectées.

Du fait de la barrière énergétique nécessaire à l'initiation du processus de fusion membranaire, ce processus est catalysé. Dans le cas des virus enveloppés, cette catalyse est prise en charge par des protéines de fusion spécialisées, les glycoprotéines virales. Comme décrit en **I.D.3.b**, de nombreuses copies de ces glycoprotéines sont présentes à la surface des particules virales sous une conformation dite pré-fusion. Ces glycoprotéines peuvent éventuellement porter, en plus de l'activité de fusion membranaire, l'activité de reconnaissance du/des récepteurs cellulaires.

En se basant sur l'étude des structures cristallographiques de l'hémagglutinine du virus de la grippe (HA) (Wilson et al., 1981), de la glycoprotéine E du virus de l'encéphalite à tique (Rey et al., 1995) et de la glycoprotéine de VSV (Roche et al., 2006, 2007), trois classes de glycoprotéines virales fusogènes sont décrites à ce jour. Presque toutes les glycoprotéines virales actuellement connues sont classées dans ces trois groupes selon leur caractéristiques structurales. La conservation des structures au sein des classes (sauf chez les glycoprotéines de classe I qui sont très différentes les unes des autres, **voir suite**) suggère que les protéines virales de fusion d'une même classe partagent un même ancêtre commun, qui aurait subi des transferts génétiques entre les familles et genres viraux au sein du même classe (revu pour les glycoprotéines de classe II dans Guardado-Calvo et Rey, 2021).

L'existence d'autres classes de glycoprotéines virales de fusion n'est pas exclue. Une nouvelle classe, qui n'est pas encore définie, pourrait être basée sur le complexe hétérodimérique E1E2 de l'hépatite C (HCV). Il est prédit que E1 possède un peptide de fusion (i.e. une séquence hydrophobe localisée en N terminal de la sous-unité fusogène de la glycoprotéine, et qui interagit avec la membrane cible au cours du processus de fusion, voir **suite**) (Torrents de la Peña et al., 2022). Le degré élevé d'homologie structurelle prédite par AlphaFold de la protéine E1 des genres Hepacivirus (e.g. HCV), Pegivirus et Pestivirus (e.g. virus de la diarrhée virale bovine BVDV) laisse penser que ces protéines partagent un mécanisme de fusion conservé et une évolution à partir d'un ancêtre commun (Olivier et al., 2022, *preprint*). Comme E1, E2 est également capable d'interagir avec les membranes (Kumar et al., 2023).

Bien que présentant une diversité importante au niveau de leurs structures, séquences et fonctions, les glycoprotéines virales catalysent l'étape de fusion membranaire en suivant un même mécanisme générique : leur interaction avec un ligand (récepteur/corécepteur à la surface des cellules, proton dans l'endosome) provoque un changement de conformation de l'état pré-fusion (métastable chez les glycoprotéines de classe I et II) de la glycoprotéine fusogène vers une conformation dite post-fusion (thermodynamiquement plus stable chez les glycoprotéines de classe I et II) (Harrison, 2015, Bullough et al., 1994). D'une part, l'énergie libérée par ce changement de conformation permet le franchissement de la barrière énergétique, nécessaire à l'initiation du processus de fusion membranaire (chez les glycoprotéines de classe I et II). D'autre part, ce changement de conformation permet l'exposition de motifs hydrophobes portés par la glycoprotéine virale (boucles de fusion ou peptides de fusion) qui interagissent avec les membranes cibles et les déstabilisent. Le double ancrage via l'ancre transmembranaire (TMD) de G (dans la membrane virale) et le peptide/boucle de fusion (dans la membrane cible) permet le rapprochement des deux membranes lors de la transition structurale. C'est la combinaison de ces deux phénomènes qui permet l'activité fusogène des glycoprotéines virales. Le processus de fusion membranaire se déroule ensuite comme présenté en **II.A** pour les trois classes de protéines virales (Chernomordik et al., 1998, Gaudin, 2000, Zaitseva et al., 2005). Quand la transition structurale a lieu en l'absence de membranes cibles, les propriétés de fusion des glycoprotéines sont inactivées (Albertini et al., 2011) pour les glycoprotéines de classe I et II. Dans les faits, deux étapes préalables sont nécessaires pour déclencher ce changement de conformation fusogène : une première étape permettant de rendre la glycoprotéine compétente pour la fusion, dite *priming*, et une deuxième étape, dite *triggering*, au cours de laquelle un signal spécifique déclenche le changement de conformation fusogène sur la glycoprotéine, étapes qui sont présentées pour chacune des trois classes dans la suite.

## **2- Les glycoprotéines de fusion virales de classe I**

La classe I regroupe les glycoprotéines de 5 grandes familles virales : Orthomyxovirus (Wilson et al., 1981, Bullough et al., 1994), Rétrovirus (Buzon et al., 2010, Weissenhorn et al., 1997), Paramyxovirus (Baker et al., 1999, Yin et al., 2005), Coronavirus (Duquerroy et al., 2005, Supekar et al., 2004, Xu et al., 2004), Arénavirus (Gallaher et al., 2001, Eschli et al., 2006) et Filovirus (Weissenhorn et al., 1998). L'hémagglutinine (HA) du virus Influenza en est le prototype.

### **a. Clivage protéolytique et activation des glycoprotéines de classe I**

Toutes les glycoprotéines de classe I présentent un site de clivage interne. Ce site de clivage se situe au niveau d'une région hydrophobe, constituée d'une 20<sup>aine</sup> d'acides aminés, qui est enfouie dans l'interface trimérique de l'état pré-fusion de la glycoprotéine (voir **II.B-4**). Cette région hydrophobe

constitue ce qu'on appelle le peptide de fusion, qui est exposé pendant la transition structurale et permet l'interaction avec la membrane cible. Les glycoprotéines de classe I sont d'abord synthétisées sous la forme de précurseurs incompetents pour la fusion qui nécessitent un clivage protéolytique pour libérer le peptide de fusion : c'est l'étape de *priming*.

Le clivage protéolytique de la forme précurseur de la glycoprotéine génère deux fragments. Le fragment N terminal (N-ter) est souvent impliqué dans la reconnaissance du récepteur cellulaire, tandis que le fragment C terminal (C-ter) porte l'activité de fusion (**Figure 17**). C'est le cas par exemple de HA du virus Influenza : initialement synthétisée sous la forme HA<sub>0</sub>, elle est clivée par une protéase (trypsine ou furine) sous une forme HA<sub>1</sub>, fragment N-ter, impliqué dans la reconnaissance du récepteur cellulaire du virus Influenza A (Weiss et al., 1988) et HA<sub>2</sub>, fragment C-ter, fusogène, qui contient le peptide de fusion et l'ancre transmembranaire (Stieneke-Grober et al., 1992). D'autres exemples sont présentés en **Figure 17**.

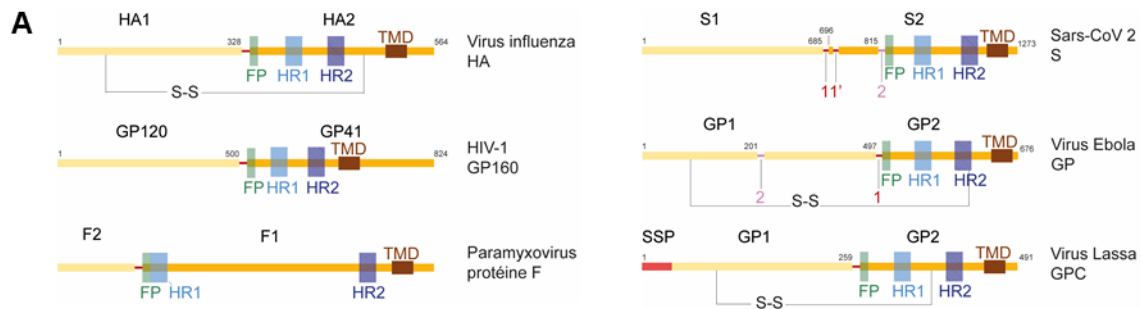
En fonction de la glycoprotéine et du type cellulaire infecté, le clivage protéolytique peut avoir lieu dans le Golgi (protéases *furine-like*), à la surface des cellules infectées (souvent *trypsine-like*) ou dans l'endosome (enzymes lysosomales comme la cathepsine) (White et Whittaker, 2016) (**Figure 17**).

En fonction des familles et genres viraux, il existe une certaine permissivité à différentes enzymes protéolytiques. Par exemple, pour la plupart des souches de virus Influenza, le clivage de HA<sub>0</sub> se fait à la surface des cellules par des protéases *trypsine-like*. En revanche, les souches hautement pathogènes (H5 et H7) présentent une accumulation de résidus basiques au niveau du site de clivage, dit multibasique, et sont clivées dans le Golgi par des protéases *furine-like* (Böttcher-Friebertshäuser et al., 2013, 2014). Les coronavirus présentent un cas particulier. La glycoprotéine S présente deux sites de clivage, appelés S1/S2 et S2. Dans le cas des SARS-CoV, la cathepsine L ou des enzymes *trypsine-like* peuvent cliver les deux sites de façon séquentielle (S1/S2 puis S2) après interaction avec le récepteur ACE2 (White et Whittaker, 2016) (sites 1 et 2, **Figure 17**). Dans le cas du SARS-CoV2, un site multibasique, supplémentaire et sensible à la furine, a été identifié (Coutard et al., 2020, Hoffmann et al., 2020, Jaimes et al., 2020b, Walls et al., 2020, Wrapp et al., 2020) (site 1', **Figure 17**). L'acquisition de ce site permet d'élargir le groupe de protéases capables de cliver les fragments S1/S2 de SARS-CoV2 à toutes les classes d'enzymes connues pouvant activer les spikes des coronavirus (Jaimes et al., 2020b).

### **Figure 17. Organisation des glycoprotéines fusogènes représentatives de la classe I**

**(A)** FP : peptide de fusion, HR1/2 : heptade *repeat* 1/2, TMD : domaine transmembranaire, S-S : pont disulfure. Les sites de clivages sont indiqués en rouge. Dans le cas du virus Ebola, GP présente deux sites de clivage : un à la furine (1) et un à la cathepsine (2) (Chandran et al., 2005). Les Arénavirus possèdent un signal peptide stable (SSP) qui est un composant essentiel de la glycoprotéine mature présente à la surface des virions (York et al., 2004, York et Nunberg, 2006). **(B)** Mécanismes de *priming* et de *triggering* des glycoprotéines de classe I représentatives de chaque genre viral.





**B**

Family	Virus (prototype)	Protein primed	Fusogenic subunit	Site of priming	Priming protease	Site of fusion	Fusion trigger
<b>Orthomyxoviridae</b>	Influenza	HA <sub>0</sub>	HA <sub>2</sub>	Golgi Plasma membrane	Furin Trypsin	Late endosome	Low pH
<b>Paramyxoviridae</b>	PIV5	F <sub>0</sub>	F <sub>1</sub>	Golgi Plasma membrane	Furin, Trypsin	Plasma membrane	Receptor
<b>Retroviridae</b>	HIV-1	GP160	GP41	Golgi	Furin	Plasma membrane	Receptor
<b>Coronaviridae</b>	SARS-CoV 2	S <sub>0</sub>	S <sub>2</sub>	Late endosome Plasma membrane / endosome Golgi	Trypsine, cathepsine TMPRSS2 / cathepsins (sites 1&2) Furine (1')	Late endosome Plasma membrane or late endosome	Receptor + protease
<b>Filoviridae</b>	EBOV	GP	GP <sub>2</sub>	Late endosome	Cathepsins	Late endosome	Low pH + additional cues
<b>Arenaviridae</b>	LassaV	GPC	GP <sub>2</sub> +SSP	Golgi	SKI/S1P	Late endosome	Low pH

Après libération du peptide de fusion par clivage protéolytique, un changement de conformation sur le fragment C-ter fusogène est nécessaire pour permettre l'exposition de ce motif hydrophobe vers la membrane cellulaire cible. Ce changement peut être induit par une grande variété de signaux dits de *triggering*, qui ne sont pas propres à une classe de glycoprotéines virales. Généralement, le mécanisme de *triggering* est conservé au sein d'une même famille virale (White et al., 2016, 2023).

La diminution du pH dans l'endosome lors de l'internalisation des particules virales dans les cellules infectées peut déclencher ce changement de conformation sur certaines glycoprotéines comme HA du virus Influenza (classe I).

La liaison à un récepteur peut induire le changement de conformation sur certaines glycoprotéines (Rétrovirus, Riedel et al., 2017, et Paramyxovirus, Navaratnarajah et al., 2020). Par exemple, la glycoprotéine GP160 du HIV-1 est initialement clivée en deux sous-unités, GP120 et GP41, par une furine à la surface des cellules. La liaison de GP120 avec son récepteur initial, CD4, induit un changement de conformation sur GP120 qui permet sa liaison avec un co-récepteur comme CCR5. Cette deuxième interaction entraîne un changement de conformation de GP41 qui permet l'exposition du peptide de fusion vers la membrane cible (Chen et al., 2019).

Cette étape de *triggering* peut aussi mettre en jeu un changement de récepteur dépendant du pH. Par exemple, la glycoprotéine GPC du virus Ebola est initialement clivée sous la forme GP1 et GP2, fusogène, par une furine à la surface des cellules cibles. Après internalisation par macropynocytose, l'abaissement du pH dans l'endosome induit un deuxième clivage, de GP1 par la cathepsine. Ce

deuxième *priming* permet l'interaction de GP1 avec le récepteur endosomal NPC1, ce qui à son tour déclencherait le changement de conformation fusogène de GP2 et initierait l'étape de fusion membranaire (Pennington et Lee, 2022).

Enfin, la fusion membranaire peut être induite directement par clivage protéolytique de la glycoprotéine associé ou non à un abaissement du pH. C'est notamment ce qui est décrit pour la spike des Coronavirus (voir **au-dessus**).

Des cas plus complexes sont également rapportés, et revus dans Harrison et al., 2015.

#### **b. Structures pré- et post-fusion des protéines de fusion virales de classe I**

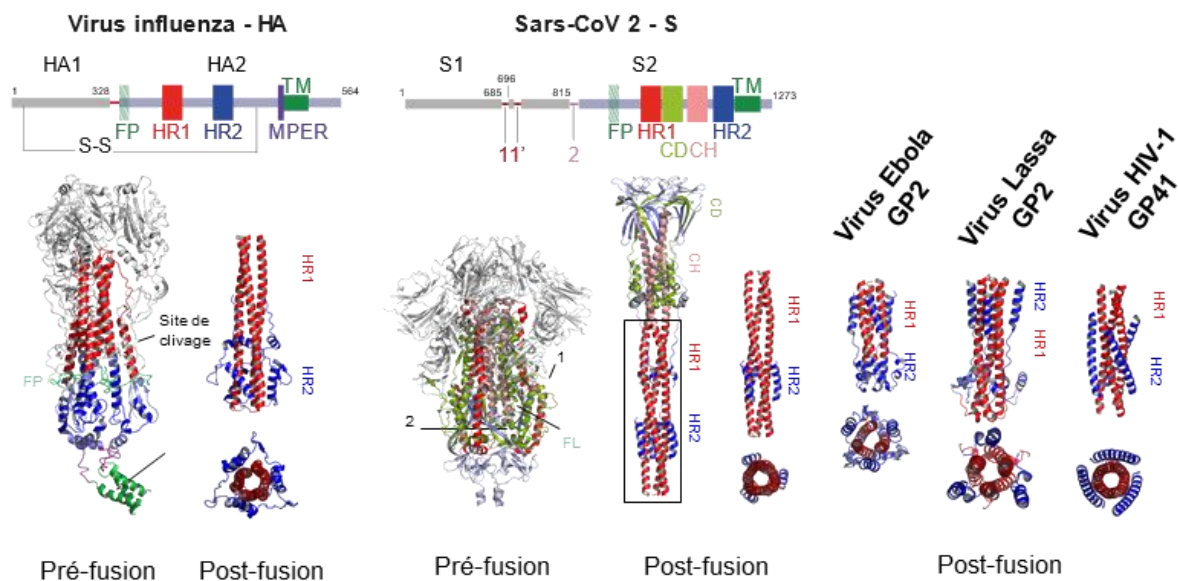
L'étude des structures pré-fusion des glycoprotéines de classe I, principalement menée par cristallographie aux rayons X jusqu'à peu, révèle : (1) une richesse en hélices  $\alpha$  des structures des glycoprotéines de classe I, (2) une assez grande diversité des structures 3D de ces protéines dans leur conformation pré-fusion et post-fusion (Rey et Shee-Mei, 2018, Weissenhorn et al., 1998), toutes trimériques à la surface des particules virales (**Figure 18.A&B**).

Par exemple, à haut pH, HA est présente sous une forme précurseur homo-trimérique dans une conformation pré-fusion à la surface des particules virales (Wilson et al., 1981) (**Figure 18.A**). Dans cette conformation, chaque protomère est constitué par une chaîne HA<sub>1</sub> et une chaîne HA<sub>2</sub> reliées par une longue boucle flexible qui contient un pont disulfure (**Figure 18.A**). HA<sub>2</sub> est constituée par un ectodomaine qui porte le peptide de fusion à son extrémité N terminale, une ancre membranaire (TMD) et un domaine intraviral ICD. La majeure partie de l'ectodomaine de HA<sub>2</sub> est constitué d'une hélice  $\alpha$  qui, associée aux deux autres hélices des deux autres protomères, forment un motif *coiled-coil*. La partie N terminale de HA<sub>2</sub>, correspondant au peptide de fusion, est enfouie le long du *coiled-coil* (**Figure 18.A**) (Harrison, 2015). Dans cette configuration, l'ectodomaine de HA est perpendiculaire à la membrane virale, il est relié à l'ancre transmembranaire (TMD) portée par HA<sub>2</sub> par un court segment appelé MPER ou CTD (voir II-5) (**Figure 18.A**).

A bas pH, les structures des glycoprotéines de classe I convergent toutes vers une structure trimérique post-fusion en épingles à cheveux qui présente un motif *coiled-coil* trimérique central sur la sous-unité fusogène de la glycoprotéine (**Figure 18**). Ceci est accompagné par le repositionnement des peptides de fusion et du TMD au niveau de la même extrémité de la protéine (Harrison et al., 2015). L'organisation de ce trimère a été décrite pour la première fois sur l'hémagglutinine HA du virus Influenza (Wilson 1981). Dans cette conformation post-fusion, HA est homotrimérique (**Figure 18.A**). Au cours de la transition structurale due à l'abaissement du pH dans l'endosome, la longue boucle sur HA<sub>2</sub> se replie en hélice qui vient se placer antiparallèlement le long du *coiled-coil*. HA<sub>2</sub> est ainsi

organisée avec un motif « hélice –  $\beta$ -hairpin – hélice » (**Figure 18.A**). L'ensemble des faisceaux d'hélices des trois protomères forme un motif dit 6HB (*6 helical-bundle*), avec trois hélices provenant du *coiled-coil* central, et les trois autres positionnées antiparallèlement le long de ce *coiled-coil*. A l'extrémité N terminale de HA<sub>2</sub>, les peptides de fusion se retrouvent positionnés du même côté que le domaine transmembranaire (TMD) et sont désormais orientés vers la membrane cible (**Figure 18.A**) (Harrison, 2015). Toutes les glycoprotéines de classe I convergent vers cette organisation en *coiled-coil* de type 6HB à bas pH (**Figure 18**).

Le motif 6HB est constitué d'une première répétition d'heptades située immédiatement en aval du peptide de fusion dans la séquence des glycoprotéines (HR1 ou HRA). Un heptade est une séquence du type hxxhcxc, où les résidus h sont généralement hydrophobes et alignés vers le centre du *coiled-coil* selon un empilement *knob-into-hole*. Les résidus c sont généralement des résidus polaires ou chargés. Pour beaucoup de glycoprotéines de classe I, le motif trimérique central *coiled-coil* est accompagné d'hélices positionnées antiparallèlement dans le sillon du faisceau central, dites C-hélices, résultant en motif 6HB (**Figure 18**). Ce motif est lié à la présence d'une deuxième répétition d'heptades (HR2 ou HRB suivant les protéines) localisée dans la partie C terminale de l'ectodomaine de la sous-unité fusogène de la glycoprotéine (**Figure 18**).



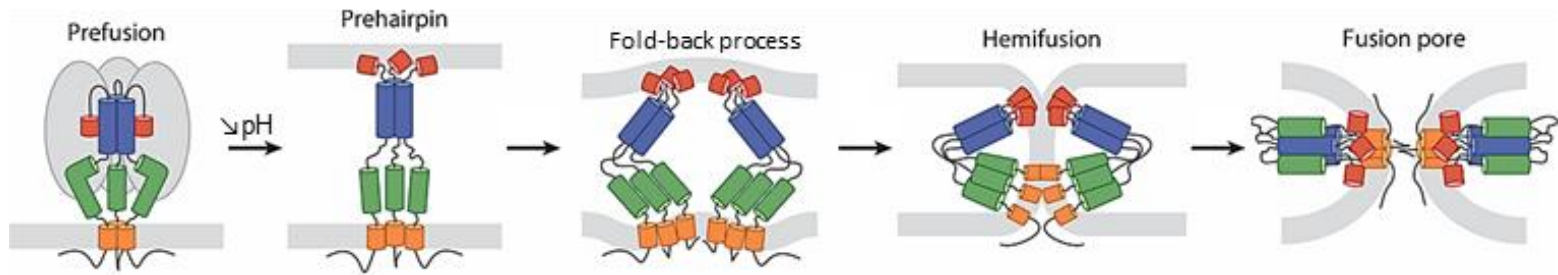
**Figure 18. Structures des glycoprotéines de classe I**

(A) Structures de HA du virus Influenza dans sa conformation pré-fusion (gauche, structure complète de HA, i.e. avec son ancre transmembranaire), dans laquelle HA<sub>1</sub> et HA<sub>2</sub> ne sont pas encore clivés et post-fusion (droite) qui correspond à HA<sub>2</sub>, après clivage. Dans la conformation pré-fusion de HA, HA<sub>1</sub> est en gris et HA<sub>2</sub> en rouge et bleu. L'heptade 1, HR1, est représenté en rouge, l'heptade 2, HR2, en bleu. (B) Structures pré- (gauche) et post-fusion (droite) de la spike S du SARS-CoV 2. Les deux structures pré-fusion présentées montrent bien la diversité des conformations pré-fusion des glycoprotéines de classe I. (C) Toutes les formes post-fusion des glycoprotéines de classe I convergent vers un motif *coiled-coil* en épingle à cheveux (vue latérale et du dessus) (PDB : 6hjr, 1htm, 6vxx, 6xra, 1env, 7tyv).

### c. Mécanisme de fusion

Le mécanisme de fusion des glycoprotéines de classe I actuellement proposé est principalement basé sur HA du virus Influenza. Les avancées récentes sont revues dans White et al., 2023. Suite à l'activation de HA0 par l'abaissement du pH dans l'endosome, HA transite d'une conformation pré-fusion vers la conformation post-fusion en passant par des états intermédiaires allongés puis repliés (**Figure 19**), ce qui permet le rapprochement des membranes virales et endosomales et leur fusion (**Figure 19**). La résolution des structures des intermédiaires de fusion de HA par cryo-EM (Benhaim et al., 2020, Benton et al., 2020), cristallographie aux rayons X (Xu et al., 2011, Serrão et al., 2021, Gao et al., 2020) et expérience de fusion sur des particules uniques (Li et al., 2022, Sengar et al., 2022) a permis de mettre en avant plusieurs caractéristiques clés (revus dans White et al., 2023) :

- (1) Trois états intermédiaires trimériques de HA sont identifiés à ce jour, dont un intermédiaire allongé (Benton et al., 2020, Calder et al., 2016).
- (2) Des études d'interaction avec des anticorps ont montré que l'étape de libération du peptide de fusion par clivage protéolytique est une étape précoce limitante de la vitesse du processus de fusion, et qui a lieu avant la dissociation entre HA<sub>1</sub> et HA<sub>2</sub> (Li et al., 2022, Benhaim et al., 2020, Benton et al., 2020).
- (3) La séparation des têtes globulaires HA<sub>1</sub> de HA<sub>2</sub> est progressive (Benton et al., 2020).
- (4) Plusieurs trimères sont regroupés au niveau du site de fusion (Kim et al., 2017, Landinsky et al., 2020).
- (5) La MPER, ou CTD, partie du segment C-terminal de HA<sub>2</sub> juste en amont de son ancre transmembranaire, est flexible et permet à l'ectodomaine d'adopter des angles différents par rapport à la membrane virale, ce qui faciliterait le changement de conformation dépendant du pH de HA (**Figure 19**) (Benton et al., 2018).
- (6) L'ancre transmembranaire de HA, portée par HA<sub>2</sub>, impacte la dynamique du changement de conformation (Benhaim et al., 2020, Benton et al., 2020) (voir **II-5.**). En particulier, il est proposé que la trimérisation du TMD serve de frein à la réorganisation du CTD de HA<sub>2</sub>.
- (7) Il est proposé que le TMD et le peptide de fusion forment un complexe dans la conformation post-fusion de HA<sub>2</sub>. Ce complexe est proposé pour avoir une influence sur la fluidité de la membrane lipidique (Chang et al., 2008, Lai et al., 2015). Néanmoins, ces résultats sont contredits par une étude postérieure (Ranaweera, 2018), et l'existence de ce complexe TMD-FP reste à confirmer.



**Figure 19. Mécanisme de fusion des glycoprotéines de classe I**

Adapté de White et al., 2023. En réponse à l'acidification de l'environnement HA transite d'une conformation pré-fusion vers la conformation post-fusion en passant par des états intermédiaires allongés puis repliés. En rouge, les peptides de fusion ; en bleu, HR1 ; en vert, HR2 ; en orange, le domaine transmembranaire ; en gris, HA<sub>1</sub> ; en noir, les domaines intraviraux.

### 3- Les glycoprotéines de fusion virales de classe II

Les glycoprotéines de classe II comprennent les glycoprotéines des familles virales suivantes : les Flavivirus (Rey et al., 1995), les Alphavirus (Lescar et al., 2001), la glycoprotéine E1 du virus de la Rubéole et au moins cinq familles de l'ordre des *Bunyavirales* (hors Arénavirus, de classe I) (revu dans Guardado-Clavo et Rey, 2021). La protéine de fusion E du virus de l'encéphalite à tique (TBEV) est en le prototype.

#### a. De la nécessité d'une protéine chaperonne chez les protéines de fusion virales de classe II

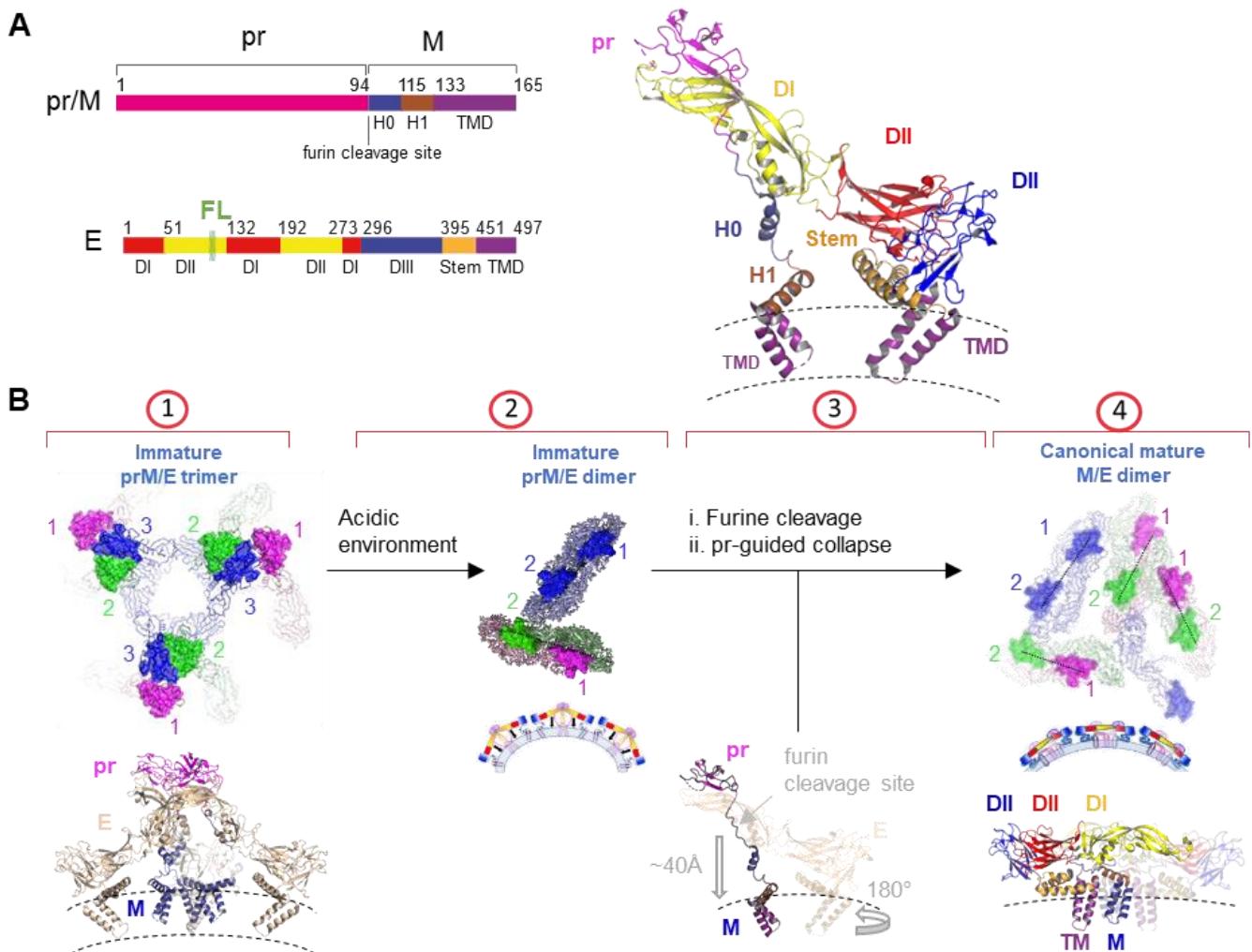
A la différence des glycoprotéines de classe I, les glycoprotéines de classe II possèdent des boucles de fusion (« *fusion loop* », FL) qui ne nécessitent pas de clivage protéolytique pour être exposées et interagir avec les membranes cibles. En revanche, elles imposent un processus de maturation finement coordonné qui permet le transport des glycoprotéines de fusion, activées à pH acide de façon irréversible, dans le réseau trans-golgien au cours des étapes de formation et maturation des nouvelles particules virales. Dans le cas des glycoprotéines de classe II, les protéines de fusion virales (E pour les Flavivirus, E1 pour les Alphavirus, Gc pour les Bunyavirus) sont toujours accompagnées d'une protéine chaperonne (prM, p62 et Gn respectivement). C'est cette protéine chaperonne qui empêche la transition structurale, irréversible, en masquant les boucles de fusion de ces glycoprotéines de classe II. De ce fait, à la différence des glycoprotéines de classe I, l'étape de *priming* a lieu sur la protéine chaperonne et non sur la protéine de fusion.

Au cours de la synthèse des protéines virales, les protéines de fusion et chaperonne font l'objet d'un repliement co-translationnel qui induit leur association en complexe tout en étant ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Plevka et al., 2011).

Dans le cas des Flavivirus, la protéine de fusion E est co-traduite avec sa protéine chaperonne, prM, au niveau du réticulum endoplasmique. Le processus de maturation actuellement proposé repose essentiellement sur des études menées sur TBEV (Pulkkinen et al., 2018), le virus de la dengue (DENV2) (Vaney et al., 2022) et plus récemment le virus Binjari (Newton et al., 2021). En particulier, le processus de maturation du virus Binjari proposé par Newton et al., 2021, est présenté ici (**Figure 20**). Il est intéressant car il intègre la résolution du linker prM non défini jusque-là, et qui permet de proposer un modèle de maturation de la glycoprotéine par « effondrement guidé par pr-M » (Newton et al., 2021) (**Figure 20**).

Dans le cas des Alphavirus, E1 et la protéine chaperonne p62 forment également un complexe trimérique à la membrane du RE. p62 est clivée par une furine en deux protéines, E2 et E3. E3 peut se dissocier ou non selon les cas du complexe formé (Kielian et al., 2010). En revanche, E2 reste associée à E1 dans les particules virales matures, sous forme d'hétérodimères formant un assemblage icosaédrique.

Les étapes de maturation des protéines fusogènes des Bunyavirus sont plus complexes, un état de l'art en est proposé dans Hulswit et al., 2021.



**Figure 20. Modèle de maturation des glycoprotéines de classe II guidé par l'effondrement de la protéine chaperonne prM chez le virus Binjari.** *Adapté de Newton et al., 2021.*

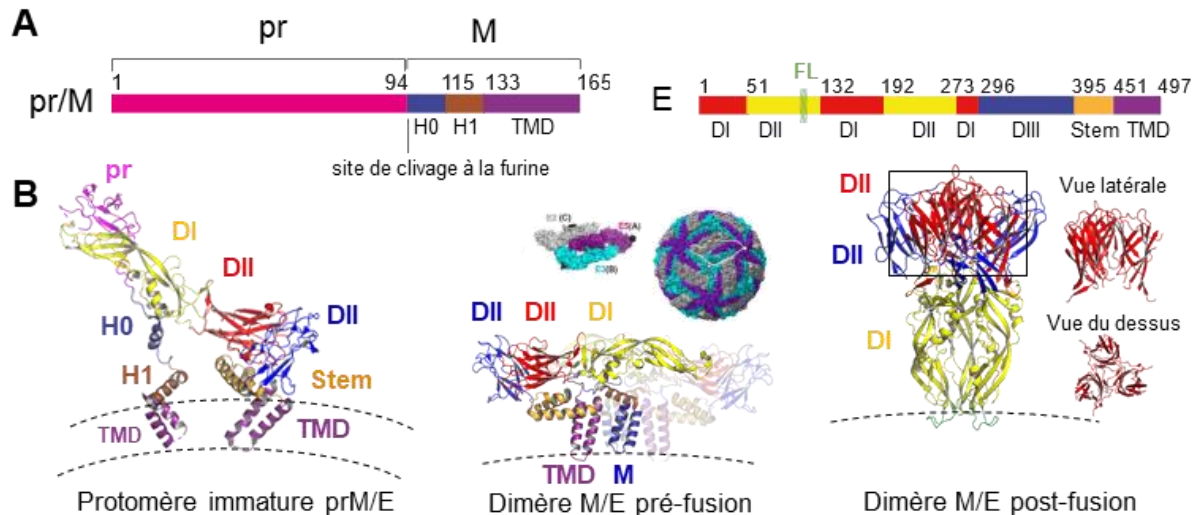
**(A)** Organisation du complexe prM/E du virus Binjari (BinJV). TMD : domaine transmembranaire ; DI-III : domaines structuraux de la protéine de fusion E ; FL : boucles de fusion ; H0-1 : domaines structuraux de la protéine M. A gauche, schéma de l'organisation en domaines de prM et E ; à droite, structure du protomère du complexe trimérique pré-fusion prM/E présent à la surface des particules immatures à l'entrée du réseau trans-golgien (PDB : 7I30). **(B)** Processus de maturation du complexe prM/E proposé suite à la résolution du linker prM non défini jusque-là pour les protéines de classe II (Newton et al., 2021). Les vues du dessus sont présentées en haut, les vues latérales en bas. Sur les vues du dessus, pr est représenté en surface, M et E en rubans selon le même code couleur qu'en (A). Le mécanisme proposé est le suivant : **(1)** Sous l'influence d'interactions latérales, le complexe prM/E forme un trimère qui génère une courbure de la membrane du RE conduisant au bourgeonnement de particules virales immatures qui rejoignent ensuite le réseau trans-golgien (TGN). Le trimère pré-fusion tel que présent à la surface des particules immatures à l'entrée du réseau trans-golgien est présenté. **(2)** L'abaissement du pH dans le TGN conduit à la dissociation du trimère en dimère prM/E immature. L'organisation de ces dimères à la surface des particules virales est représentée en vue du dessus. Les particules immatures présentent un aspect hérissé à leur surface (coupe transversale : M est bleu, E jaune et rouge, FL vert, pr rose). Le changement d'organisation du complexe prM/E expose un site de clivage à la furine sur la protéine chaperonne prM, entre M et pr. **(3)** Le clivage du site par la furine entraîne un réarrangement du linker pr, qui guide l'ectodomaine de E vers M (il « s'effondre »). En parallèle, le domaine TMD de E effectue une rotation. La surface des particules virales est présentée en coupe en dessous : elle est désormais « lisse ». pr, qui est encore liée à E, bloque l'insertion des boucles de fusion dans une membrane cible. **(4)** Dans la plupart des cas, pr est dissocié passivement du complexe mature dimérique M/E suite à l'exposition au pH neutre du milieu extracellulaire des particules virales (excepté chez YFV, Crampon et al., 2023). Les virions matures présentent une surface lisse recouverte de dimères M/E, dits canoniques, parallèles à la membrane virale et dont les FL sont libres et prêts à interagir avec les membranes cibles. La structure du dimère M/E de BinJV n'étant pas résolue, celle de DENV 2 est présentée ici (PDB : 6zqu). Le 2<sup>ème</sup> protomère est représenté en transparence pour des raisons de clarté.

### **b. Organisation structurale des protéines de fusion virales de classe II**

Les glycoprotéines de fusion de classe II (E, E1, Gc) sont constituées de trois domaines structuraux (DI-III) essentiellement organisés en feuillets  $\beta$  (**Figure 21**) (Guardado-Clavo et Rey, 2021).

A la surface des particules virales matures, la protéine de fusion est présente sous une forme dimérique (et non trimérique comme chez les glycoprotéines de classe I) dans sa conformation pré-fusion, formant un assemblage icosaédrique (Guardado-Clavo et Rey, 2021). Dans cette conformation, le domaine DI de E présente deux feuillets antiparallèles et est entouré de chaque côté par les domaines DII et DIII qui tapissent la surface des particules virales sous forme de dimères (**Figure 21**). De nouveau, à la différence des classes I, les protéines de fusion sont, dans leur conformation pré-fusion, parallèles et non perpendiculaires à la membrane virale. Les boucles de fusion sont portées à l'extrémité du domaine DI et sont enfouies à l'interface E1-E2 pour les Alphavirus, et E-E pour les Flavivirus.

A la fin du processus de fusion, les glycoprotéines de classe II présentent une organisation trimérique. Cette organisation se rapproche de celle des glycoprotéines de classe I du fait du repositionnement des boucles de fusion à proximité du TMD, au niveau d'une extrémité allongée perpendiculaire à la membrane (**Figure 21**), ce qui rappelle le motif en épingle des glycoprotéines de classe I (Bressaneli et al., 2004).



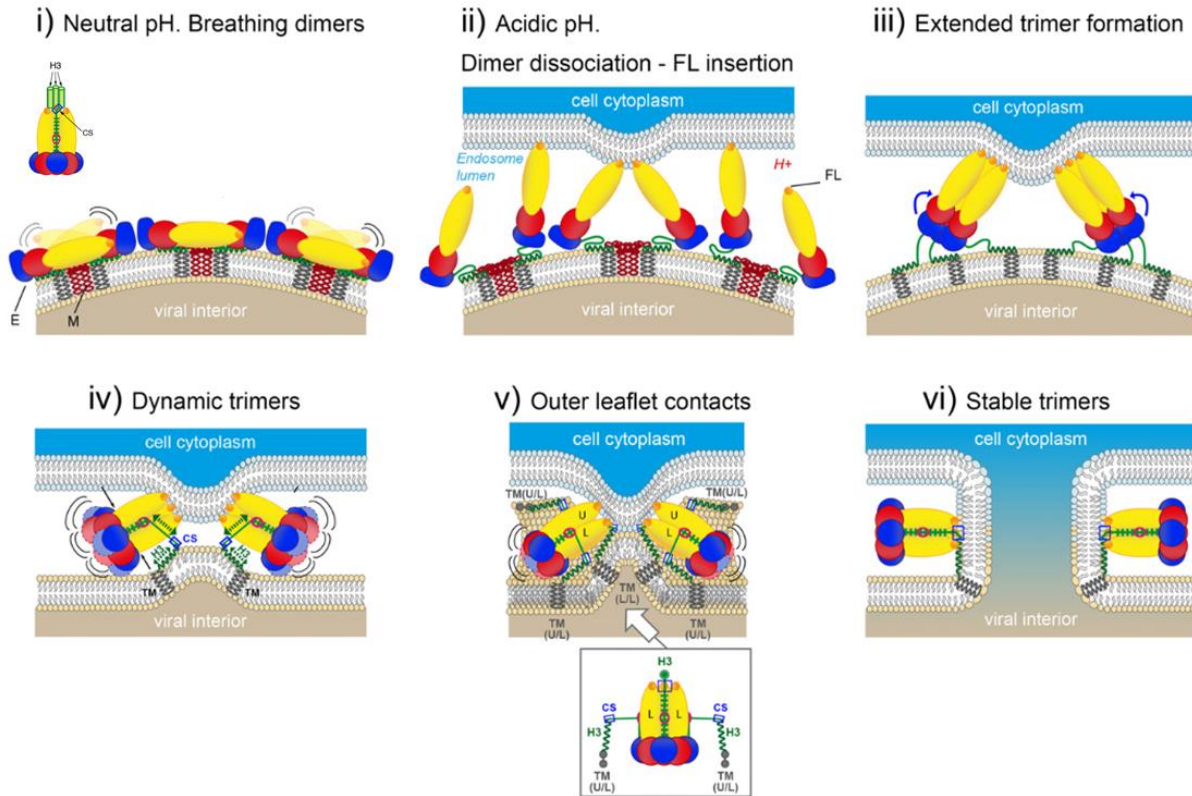
**Figure 21. Structures des glycoprotéines de classe II**

(A) Organisation du complexe prM/E du virus Binjari (BinJV). TMD : domaine transmembranaire, DI-III : domaines structuraux de la protéine de fusion E, FL : boucles de fusion, H0-1 : domaines structuraux de la protéine M. A gauche, organisation en diagramme du complexe prM/E ; à droite, structure du protomère du complexe trimérique pré-fusion prM/E présent à la surface des particules immatures à l'entrée du réseau trans-golgien (PDB : 7I30). (B) Les différentes conformations majeures adoptées par le complexe fusogène des Flavivirus au cours du cycle infectieux : à gauche, la forme immature prM/E de BinJV, au milieu la forme mature canonique de M/E du virus de la dengue 2 (DENV2) tel que présent à la surface des virions. (PDB : 6zqu) (C) Conformation post-fusion de la protéine de fusion virale E de DENV2. Notez l'absence de *coiled-coil* central présent chez les glycoprotéines de classe I et II. (PDB : 1ok8).

### c. Mécanisme de fusion médié par les glycoprotéines de classe II

Comme présenté au-dessus, la protéine E de classe II est homodimérique à la surface des virions matures. En réponse à l'abaissement du pH, les dimères E-E se dissocient. D'abord, E, alors sous forme monomérique, interagit avec la membrane cible par ses boucles de fusion. Les monomères E s'organisent ensuite en trimères, formant ainsi le trimère en épingle à cheveux classique (Kelian, 2014) (**Figure 22.iii**). Des états intermédiaires de E au cours du processus de fusion ont été identifiés, notamment par exemple chez virus Chikungunya ou le virus de la dengue (DENV) (Mangala Prasad et al., 2022, Klein et al., 2013). Une étude comparative récente de la région reliant l'ectodomaine au domaine transmembranaire de E du Flavivirus TBEV, dite Stem, a permis de proposer un nouveau mécanisme de fusion commun aux Flavivirus (Medits et al., 2020) (**Figure 22**).





**Figure 22. Mécanisme de fusion proposé pour les glycoprotéines de fusion des Flavivirus (classe II)**

Extrait de Medits et al., 2020. **(i)** Organisation de E et M à la surface des particules virales mature. Le code couleur est le même qu'utilisé précédemment. Le *breathing* interne de E et entre dimères de E, indiqué par les lignes noires, permet l'exposition transitoire des boucles de fusion (FL) normalement enfouies à l'interface entre les dimères. **(ii)** L'environnement acide de l'endosome provoque la dissociation des dimères de E, ce qui permet l'exposition des FL et leur insertion dans la membrane endosomale. **(iii)** Suite à l'insertion des FL dans la membrane cible, E forme un intermédiaire allongé trimérique reliant les deux membranes. La relocalisation qui s'en suit du domaine III de E sur les côtés du trimère permet le changement individuel de conformation de chaque protomère au sein du trimère vers une conformation en épingle à cheveux. **(iv)** La relocalisation du domaine III provoque à son tour la relocalisation du segment reliant l'ectodomaine de E au domaine transmembranaire, dit Stem (en vert sur le schéma). La partie N terminale de Stem s'ancre ainsi dans le sillon  $\alpha$ A/B (cercle rouge) pour former un autre intermédiaire de fusion, dynamique, appelé « *breathing trimer* » (indiqué par les lignes noires). La partie C terminale de Stem, dite H3, et le TMD de E sont attirés vers le domaine II tout en restant associés à la membrane (flèches vertes). La région conservée de Stem chez les Flavivirus, dite CS, est encadrée en bleu. **(v)** Il est proposé que les forces de tractions du TMD, asymétriques, orientent le trimère avec un protomère proche de la membrane cible (U sur le schéma) et deux protomères qui restent proches de la membrane virale (L sur le schéma). Cette organisation spatiale suggère que le segment Stem compris entre les deux protomères L se referme en premier jusqu'aux FL, tandis que les deux autres segments Stem (localisés entre les unités L et U) ne sont que partiellement fermés (le zoom présente cette organisation). **(vi)** La formation du pore de fusion est permise par l'organisation de E en trimère post-fusion dans lequel les Stem sont complètement fermés le long des trois côtés du trimère. Dans cette conformation, la région CS interagit avec les boucles de fusion et le segment H3 repose sur la membrane fusionnée.

#### 4- Les glycoprotéines de fusion virales de classe III

La classe III est la dernière famille des glycoprotéines de fusion virale établie à ce jour. Elle regroupe les glycoprotéines des Rhabdovirus animaux (Roche et al., 2006,2007 ; Gaudin et al., 2000, Belot et al., 2020, Yang et al., 2020), plusieurs glycoprotéines de fusion d'Herpesvirus (HHV) dont gB de HSV-1 (Heldwein et al., 2006, Vollmer et al., 2020), de EBV (Bakovic et al., 2009a), du CMV (Chandramouli et al., 2015, Liu et al., 2021), de VZV (Xing et al., 2015), la GP64 des Baculovirus (Kadlec et al., 2008) et la Gp des Thogotovirus (Peng et al., 2017). La protéine de fusion G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est le prototype de la classe III. Les glycoprotéines de classe III sont ainsi retrouvées parmi une grande diversité de virus : à ADN, à ARN, rétrovirus, arbovirus, infectant des insectes, des mammifères...

Des analyses bio-informatiques et des études des propriétés de fusion des glycoprotéines virales suggèrent l'appartenance de plusieurs autres familles aux classe III : les G des Tibrovirus, de la famille des *Rhabdoviridae* (Steffen et al., 2013) et la G des Bornavirus (Garry et Garry, 2009) entre-autre. Très récemment, il a été publié que G des Tibrovirus partagent effectivement des propriétés propres à la classe III (organisation, boucles de fusion, etc... voir **II-C**). Notamment, l'abaissement du pH initie le changement de conformation de G et ce changement est réversible, ce qui est la spécificité des glycoprotéines de classe III (Munyeku-Bazitama et al., 2024) (voir **II-C**, où les propriétés de fusion des glycoprotéines de classe III sont présentées).

Les glycoprotéines de classes III partagent des éléments structuraux propres aux classes I et II. Les glycoprotéines de classe III sont organisées en trois domaines structuraux (**Figure 23**) : un domaine de fusion (FD), inséré dans une boucle d'un domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD), lui-même inséré dans une boucle du domaine de trimérisation (TrD) (Roche et al., 2006,2007, Belot et al., 2020, Yang et al., 2020) (**Figure 23**). L'organisation du domaine de fusion, très conservée au sein des classes III, rappelle l'organisation des glycoprotéines de classe II. Ce domaine FD est organisé en feuillets  $\beta$  à l'extrémité desquels se trouvent les deux boucles de fusion. Le domaine de trimérisation présente quant à lui un repliement en hélice  $\alpha$ . VSV G est trimérique dans ses conformations pré et post-fusion, et perpendiculaire à la membrane. Les hélices des TrD des trois protomères post-fusion de G forment un faisceau d'hélices trimérique (motif 6HB) (**Figure 23**) qui rappelle celui des glycoprotéines de classe I (Roche et al., 2006,2007).

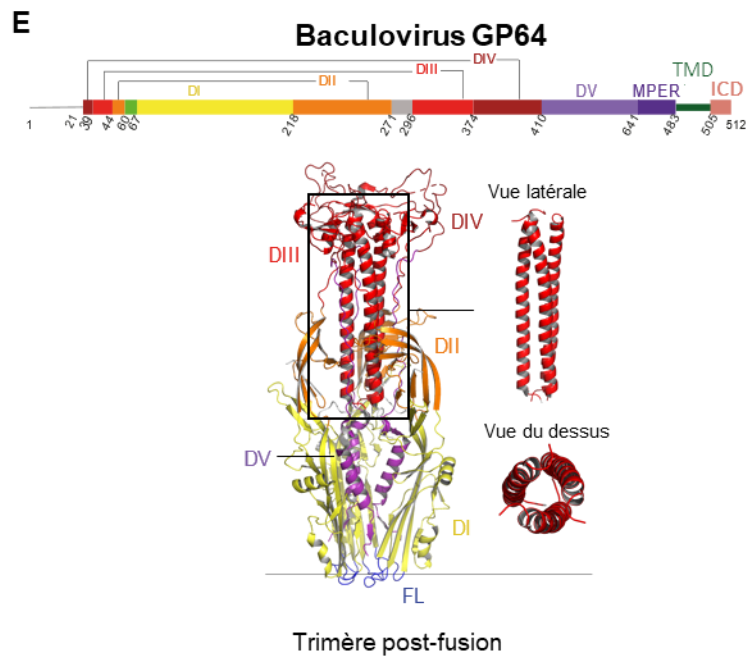
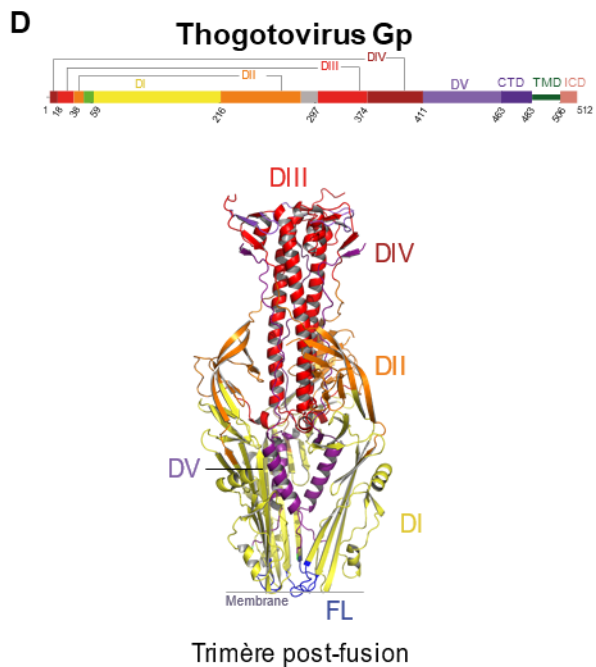
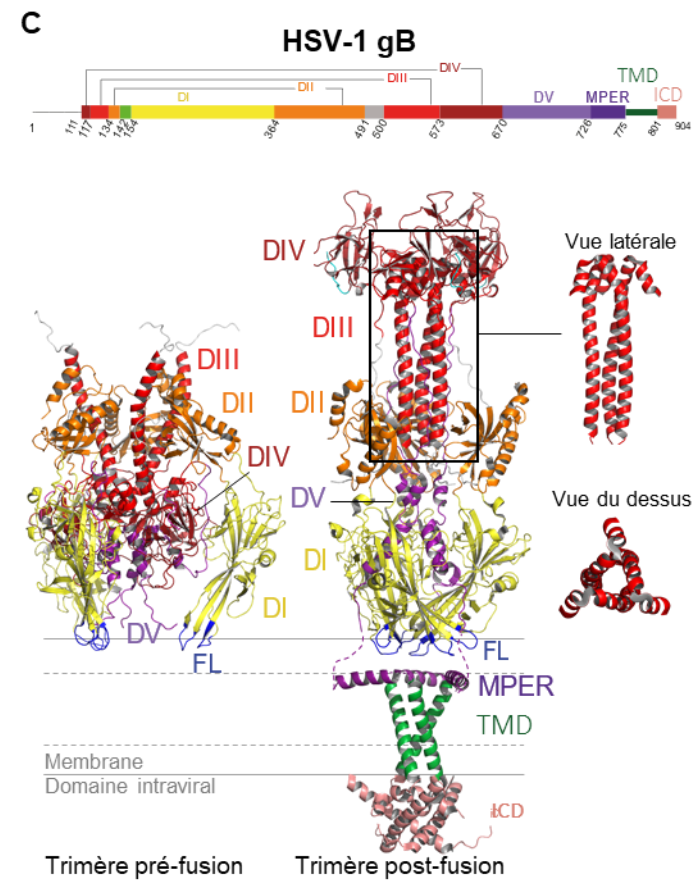
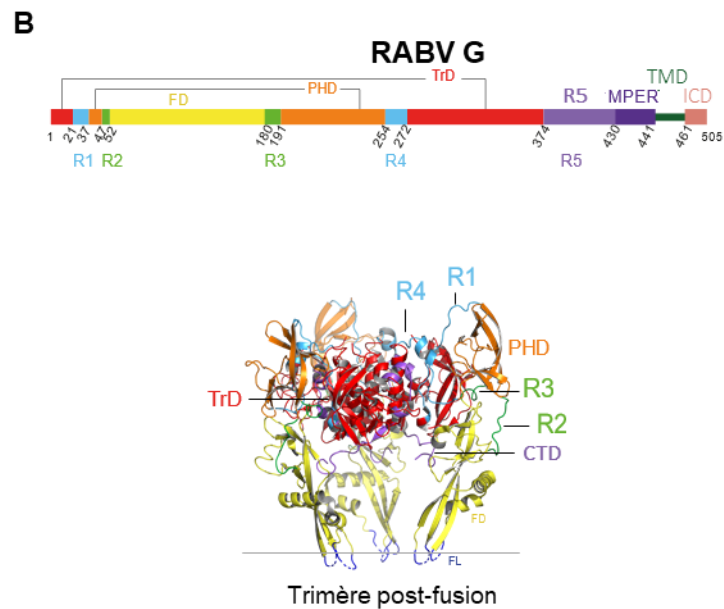
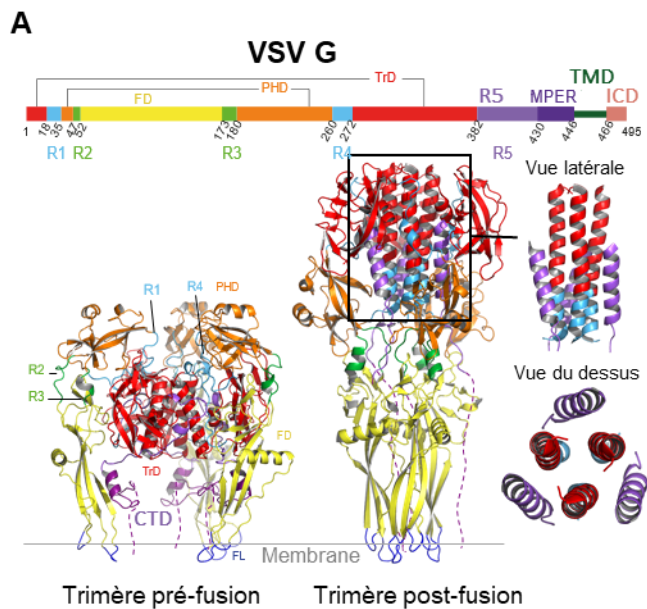
A la différence des glycoprotéines de classe II, aucune étape de *priming* n'est nécessaire à l'activation des glycoprotéines de classe III. Le changement de conformation fusogène de G, initié par l'abaissement du pH au sein de l'endosome chez les Vésiculovirus et les Lyssavirus, implique un repositionnement des domaines structuraux les uns par rapport aux autres sans que leurs structures ne soit modifiée. Ce repositionnement est permis par le changement de conformation des régions charnières reliant ces différents domaines (**Figure 23**) (Roche, 2006,2007). A la fin de cette transition

structurale, la partie N-terminale de la région charnière (R5) reliant l'ectodomaine de ces glycoprotéines au TMD est partiellement repliée en une hélice  $\alpha$  allongée venant s'insérer antiparallèlement dans le sillon du faisceau d'hélices central formé par les trois TrD (**Figure 23**). Un motif de type 6HB est ainsi formé, rappelant celui des glycoprotéines de classe I.

Le détail de la machinerie de fusion de la G des Rhabdovirus, en particulier des Vésiculovirus et des Lyssavirus, est présenté en **II.C**.

### **Figure 23. Structure des glycoprotéines de classe III (page suivante)**

L'organisation des glycoprotéines représentatives des genres viraux de la classe III, leurs structures pré- et post-fusion et le motif typique de la forme post-fusion sont présentés ici. Les boucles de fusion sont en bleu foncé. **(A)** Pour le genre Vésiculovirus, les structures pré- et post-fusion de VSV G ont permis de définir la classe III. L'organisation en domaines de VSV G est présentée : le domaine de fusion (FD) est inséré dans un domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD) lui-même inséré dans un domaine de trimérisation (TrD) (Roche et al., 2006,2007). L'hélice 6HB de la forme post-fusion est présentée. (PDB : 5i2m, 6tit). L'ectodomaine de G est relié au domaine transmembranaire (TMD) par un segment C-terminal (R5) et présente notamment une MPER en amont du TMD. La partie intravirale de G est présentée couleur saumon. **(B)** Le trimère pré-fusion de RABV (souche Pasteur) a été récemment résolu (Ng et al., 2022, Callaway et al., 2022). Il montre une organisation proche de celle de VSV. De façon notable, le PHD semble diverger le plus de la structure de VSV G. Aucune structure trimérique post-fusion n'est résolue à ce jour chez les Lyssavirus. (PDB : 7u9g) **(C&D)** Plusieurs structures de glycoprotéines d'herpès virus ont été résolues. Les trimères pré- et post-fusion de la gB de HSV-1 **(C)** et de HCMV (human cytomegalovirus) sont présentées **(D)**. Elles s'organisent similairement à GP64. La structure complète de conformation post-fusion de gB est résolue (Cooper et al., 2018). Elle est commentée en **II.C-5**. Comme pour GP64, les gB des herpes virus présentent un faisceau d'hélices dans leur conformation post-fusion, de type 3HB, qui est présenté (HSV-1 PDB : 6z9m, 5v2s ; HCMV PDB : 7kdp, 7kdd). **(E)** Le trimère post-fusion de GP64 des Baculovirus présente une organisation et une topologie similaires à celles de VSV G. Le domaine DI, qui correspondrait au FD de VSV, est inséré dans un domaine DII, équivalent au PHD de VSV, inséré lui-même dans un domaine DIII puis DIV, équivalents au TrD de VSV. Le faisceau d'hélices de la conformation post-fusion, motif 3HB, est présenté. (PDB : 3duz)



## 5- Importance des segments des glycoprotéines virales interagissant avec les membranes

Les segments des glycoprotéines fusogènes capables d'interagir avec les membranes sont ses boucles ou peptides de fusion, son domaine transmembranaire (TMD) et son domaine MPER pour *membrane proximal external region*. Ils jouent un rôle clé dans le succès de la fusion membranaire médiée par la glycoprotéine virale. Il est rapporté que le domaine intraviral (ICD) de cette dernière peut également jouer un rôle en modulant la localisation de l'évènement de fusion et les changements de conformation (Barrett et al., 2020).

Compte tenu du propos de cette thèse, un bref panorama de l'état des connaissances sur les rôles joués par les TMDs et MPERs est présenté **ici** pour les glycoprotéines de classe I et II et en **II.C-3** pour celles de classe III. L'organisation et les rôles joués par ces deux segments restent encore mal compris aujourd'hui. Ils sont le mieux caractérisés chez les glycoprotéines de classe I (Barrett et Dutch, 2020).

**MPER.** Ces segments assurent la jonction entre l'ectodomaine de la glycoprotéine et son domaine transmembranaire et sont le plus souvent des régions amphipathiques. Il s'agit du segment le plus carboxy-terminal de l'ectodomaine des protéines de fusion virales. Les MPERs sont présentes chez toutes les classes de glycoprotéines (White et al., 2023). Elles sont principalement caractérisées par leur flexibilité qui permet une plus grande liberté d'orientation de l'ectodomaine des glycoprotéines pour se lier à leurs récepteurs, comme cela a par exemple été montré pour GP120 de HIV (Manga et al., 2022), S de SARS-CoV2 (Kapoor et al., 2022) et HA du virus Influenza (Benton et al., 2018). Par exemple, cette flexibilité apparaît également importante au cours de la transition structurale de la protéine fusogène comme cela a été montré sur HA du virus Influenza A (Benton et al., 2018). Elle permet probablement à la glycoprotéine de s'accommoder aux membranes très incurvées des intermédiaires membranaires de fusion (**Figure 16**). Il a aussi été montré que la MPER de GP41 de HIV est capable d'interagir avec les membranes (Reardon et al., 2014, Lee et al., 2016).

**TMD.** La plupart des domaines TMDs adoptent une conformation en hélice  $\alpha$  (White et al., 2023) (**Figure 24**). La flexibilité de la région entre le TMD et la MPER est caractéristique des glycoprotéines de classe I, comme rapporté pour HA du virus Influenza A (Benton et al., 2020), GP de Ebola (Beniac et al., 2017) et S de SARS-CoV (Kawase et al., 2019). Seuls les paramyxovirus ne semblent pas suivre ce modèle (Baker et al., 1999). L'existence d'un intermédiaire étendu de HA au cours de la transition structurale a récemment été montrée (Benton et al., 2020). Des expériences de FRET ont mis en évidence un *breathing* important de HA avant la formation de cet intermédiaire étendu (Das et al., 2018). La flexibilité du TMD par rapport à l'ectodomaine pourrait être importante dans les dynamiques

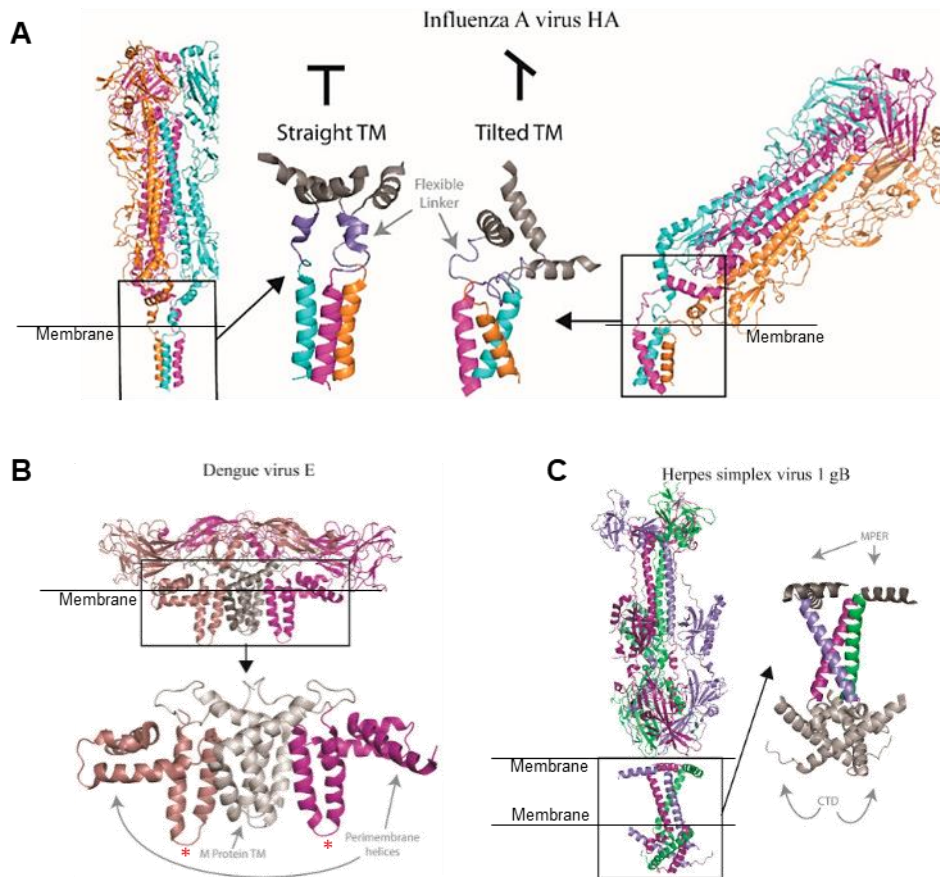
de transition structurales aboutissant à la formation de cet intermédiaire (Benton et al., 2018). En plus de cette flexibilité inter-régions, la présence de glycines au sein des TMDs serait critique pour permettre le degré important d'angles que le TMD adopte par rapport à l'ectodomaine de la glycoprotéine au cours de la transition structurale (**Figure 24**). C'est notamment ce qui est décrit pour HA du virus Influenza A, dont le TMD peut former des angles de 52° avec l'ectodomaine (Benton et al., 2018), et chez les glycoprotéines de classe II (Zhang et al., 2011).

Ensuite, il semble également que les TMDs au sein d'un même trimère soient associés, notamment par le biais d'une tyrosine centrale chez HA (Benton et al., 2018) et par le motif d'oligomérisation GXXXG et l'arginine R696, centrale, du TMD de GP41 de HIV-1 (Miyachi et al., 2010). Dans le cas des glycoprotéines de Paramyxovirus, un motif leucine-Isoleucine *zipper* est identifié comme indispensable à l'oligomérisation des TMDs (Webb et al., 2017). Chez les glycoprotéines de classe II, les hélices des deux TMDs associés s'organisent en *coiled-coil*, les résidus hydrophobes portés par ces motifs étant orientés vers l'extérieur de ce *coiled-coil* (Zhang et al., 2013). Ces résidus semblent jouer un rôle similaire à celui du motif leucine-*zipper* des Paramyxovirus (Webb et al., 2017).

De nombreuses glycoprotéines virales de fusion présentent des motifs de liaison au cholestérol au niveau de leur TMD ou leur domaine intraviral (ICD) (Lee et al., 2021, Schwarzer et al., 2014, de Vries et al., 2015, Barrantes et al., 2022). Ces motifs contribuent à la localisation de certaines de ces protéines au niveau de microdomaines enrichis en cholestérol (Chlanda et al., 2016). Il semblerait que la composition de la membrane puisse également avoir un impact sur l'état d'oligomérisation de certaines glycoprotéines, comme cela a été montré sur la GP du virus Marburg (glycoprotéine de classe I) (Liu et al., 2019).

Enfin, il a été suggéré que le TMD et les boucles ou peptides de fusion puissent directement interagir entre eux et aider au processus de fusion. Cependant, les travaux tendent à se contredire et des études supplémentaires sont nécessaires (revu dans Berrett et Dutch, 2023).

Un état de l'art très complet de l'importance de ces segments dans le processus de fusion membranaire médié par les glycoprotéines de fusion virales est réalisé dans Barrett et Dutch, 2020.



**Figure 24. Organisation du TMD et de la MPER de glycoprotéines de fusion de classe I, II et III**

**(A)** Structure de HA entière du virus influenza dans sa conformation pré-fusion trimérique (PDB : gauche, 6hjq, droite, 6hqr). Dans la deuxième structure, l'ectodomaine présente un angle de  $52^\circ$  par rapport au TMD. Dans les encarts, le segment flexible est indiqué. (Benton et al., 2018) **(B)** Structure complète de la glycoprotéine E de DENV (PDB : 3j2p). Les boucles hydrophobes du TMD de E sont indiquées par une étoile rouge (Zhang et al., 2013). **(C)** Structure complète de la gB de HSV-1 (PDB : 5v2s). Les domaines intraviraux sont en gris dans l'encart (Cooper et al., 2018). (Extrait de Barret et Dutch, 2023)

## C. Spécificités de la machinerie de fusion des Rhabdovirus

### 1- Propriétés de fusion des glycoprotéines de Vésiculovirus et Lyssavirus, de classe III

Des expériences de fusion entre VSV ou RABV avec des liposomes ont montré qu'aucune classe de lipides n'est spécifiquement nécessaire à l'activité de fusion de VSV G (Yamada and Ohnishi, 1986, Herrmann et al., 1990) et RABV G (Gaudin et al., 1991).

La sensibilité des G de différents Rhabdovirus à l'abaissement du pH est assez similaire d'un virus à l'autre (Clague et al., 1990, Gaudin et al., 1999, Roche and Gaudin, 2004) : l'activité de fusion est optimale autour de pH 6,0 et elle n'est pas observée au-dessus de pH 6,5 (Gaudin, 2000a).

Une pré-incubation des virus à bas pH en l'absence de membrane cible conduit à l'inhibition complète d'activité de fusion (Clague et al., 1990 ; Gaudin et al., 1991). Cette inhibition est réversible

(Doms et al., 1987 ; Gaudin et al., 1993 ; Kim et al., 2017). En effet, une ré-incubation du virus à un pH supérieur à 7 restaure l'activité de fusion de G.

Cette réversibilité du changement de conformation induisant la fusion est essentielle : elle permet à la glycoprotéine nouvellement synthétisée d'être transportée à travers les compartiments acides de l'appareil de Golgi et de retrouver sa conformation native à la surface des particules virales néosynthétisées (Gaudin et al., 1995). Il existe donc un équilibre dépendant du pH entre les états pré- et post-fusion de G (Roche and Gaudin, 2002). Il est déplacé vers la forme post-fusion à bas pH (Roche and Gaudin, 2002). Cette propriété est unique aux glycoprotéines de Rhabdovirus.

## **2- Une coopérativité nécessaire au processus de fusion**

Il est proposé que le changement de conformation des protéines virales de fusion de la conformation pré-fusion vers la conformation post-fusion thermodynamiquement plus stable libère une énergie suffisante à la formation des états intermédiaires de haute énergie du processus de fusion membranaire (Harrison, 2015). Dans le cas des glycoprotéines de classe III, du fait de l'équilibre thermodynamique entre les différentes conformations de G, ce changement de conformation ne libère que  $\sim 2,5$  kT par trimère (Roche et Gaudin, 2002). Or, la barrière énergétique à surmonter au cours du processus de fusion membranaire est estimé à  $\sim 40$  kcal/mol (Lee and Lentz, 1998, Kuzmin et al., 2001). D'où, dans le cas des glycoprotéines de classe III, la nécessité d'une coopération entre les G au cours du processus de fusion membranaire (Roche et Gaudin, 2002).

L'analyse par cryo-EM et cryo-ET de la particule virale de VSV G à haut et bas pH confirme l'existence de réseaux supramoléculaires de G à la surface des particules virales (Zhou et al., 2022, Libersou et al., 2010).

A pH neutre, la surface des particules virales, G est généralement organisée et observée sous forme de trimères et monomères pré-fusion (Libersou et al., 2010, Baquero et al., 2017) : il existerait un équilibre entre ces conformations. Néanmoins, Zhou et al., 2022, ont montré que par endroits, G présente une supra-organisation en cluster de trimères suivant un schéma hexagonal (**Figure 25.A-C**) (Zhou et al., 2022), qui rappelle les structures cristallines des trimères pré-fusion de  $G_{th}$  (Roche et al. 2007, Roche et al., 2008).

A bas pH, les trimères de G s'organisent également en hexagones (**Figure 25.A-C**) (Zhou et al., 2022, Libersou et al., 2010). Les résidus 8 à 14 de G, appartenant à un segment non structuré et flexible du domaine TRD, seraient impliqués dans l'interaction entre ces trimères (Zhou et al., 2022).

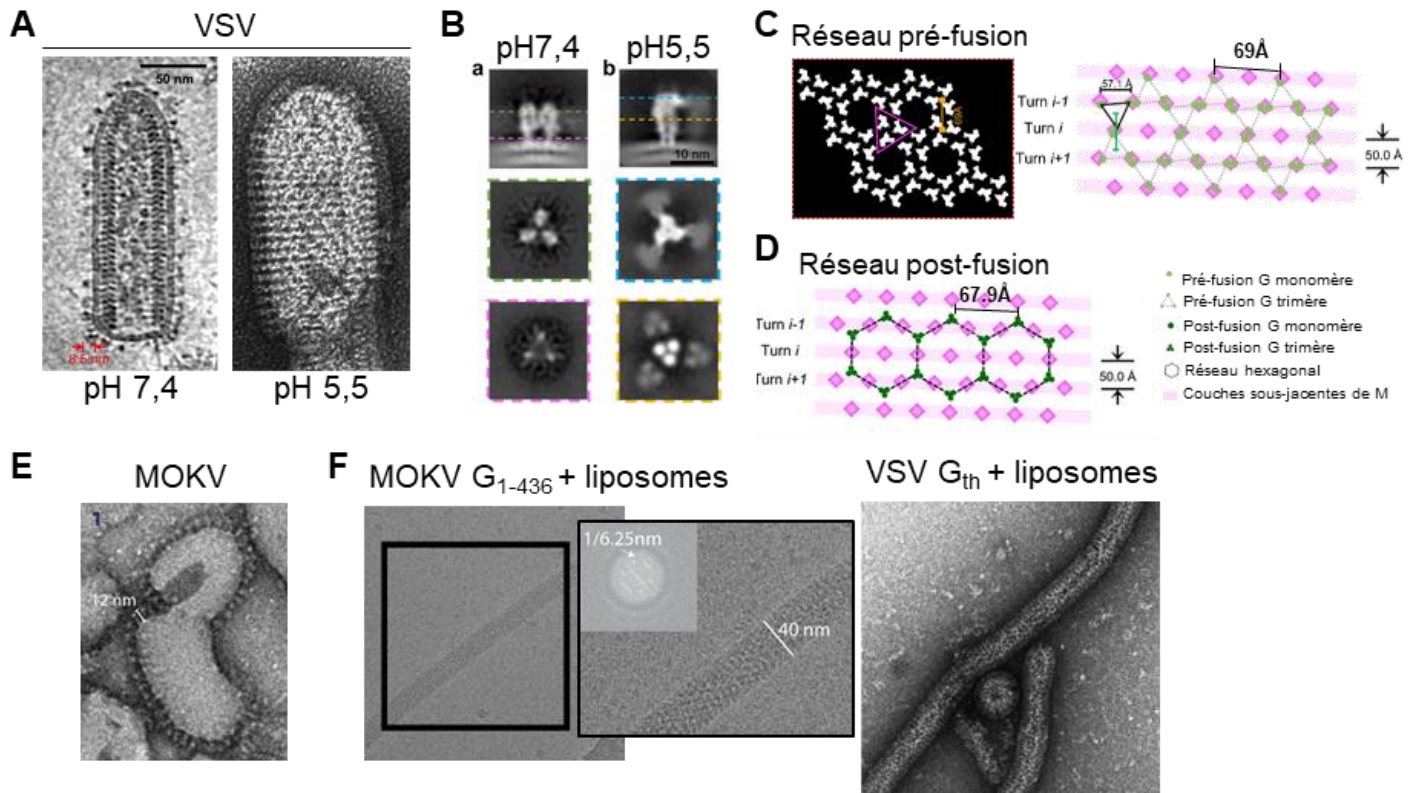
L'étude d'évènements individuels de fusion par microscopie électronique pour VSV (Libersou et al., 2010) montre que la fusion se déroulerait en deux étapes. Lors de la première étape, les G situées



sur la base plate de VSV interagissent avec la membrane cible, ce qui pourrait faciliter des déformations locales des membranes menant à la formation d'un ou plusieurs diaphragmes d'hémifusion et du pore initial. L'organisation en réseau hexagonal de la forme pré-fusion de VSV G (Libersou et al., 2010, Zhou et al., 2022) (**Figure 25.B&C**) favoriserait cette coopérativité nécessaire entre les trimères de G (Zhou et al., 2022). Ensuite, la formation d'un réseau hélicoïdal de trimères post-fusion de G sur la partie cylindrique de la particule virale (en dehors de la zone de contact), pourrait engendrer des tensions au niveau de la membrane entraînant l'élargissement du pore de fusion et conduisant à la fusion complète (Libersou et al., 2010) (**Figure 25.A-C**). La formation de ce réseau implique des interactions latérales entre les trimères de glycoprotéines et permet probablement de surmonter la barrière énergétique importante nécessaire à l'élargissement du pore de fusion. Le nombre critique de trimères de G nécessaires à cette étape est estimé entre 3 et 5 (Roche et Gaudin, 2002, Kim et al., 2017).

Dans le cas des Lyssavirus, en particulier pour RABV G, il est estimé que 15 glycoprotéines dans leur conformation pré-fusion (soit 5 trimères) sont nécessaires pour apporter l'énergie suffisante au processus de fusion membranaire (Roche et Gaudin, 2002). L'état oligomérique des LYSV G à la surface des particules dans l'état pré-fusion n'est pas clairement établi. Il est établi en revanche que LYSV G forme des réseaux hélicoïdaux semblables à ceux de VSV G à bas pH. Un réseau semblable a ainsi été observé à la surface de particules de VSV pseudotypées avec MOKV G WT (Belot et al., 2019) à bas pH (**Figure 25.E**). Le même réseau est observé à la surface de particules de VSV pseudotypées avec une forme de MOKV G pour laquelle les motifs hydrophobes des boucles de fusion ont été mutés en motifs hydrophiles (Belot et al., 2019). Les boucles de fusion n'interviennent donc pas dans la stabilisation des trimères post-fusion.

L'incubation à bas pH de liposomes dans lesquels l'ectodomaine de MOKV G est inséré induit leur déformation d'une forme sphérique vers des structures tubulaires allongées (**Figure 25.F**). Cette propriété, aussi retrouvée chez les G de Vésiculovirus (Libersou et al., 2010) (**Figure 25.F**), confirme la capacité du réseau hélicoïdal de G sous sa conformation post-fusion à appliquer des contraintes mécaniques déformantes sur les membranes dans lesquelles G est insérée, et renforce l'hypothèse de son rôle dans la formation et l'élargissement du pore de fusion.



**Figure 25. Les réseaux formés par la G des Rhabdovirus**

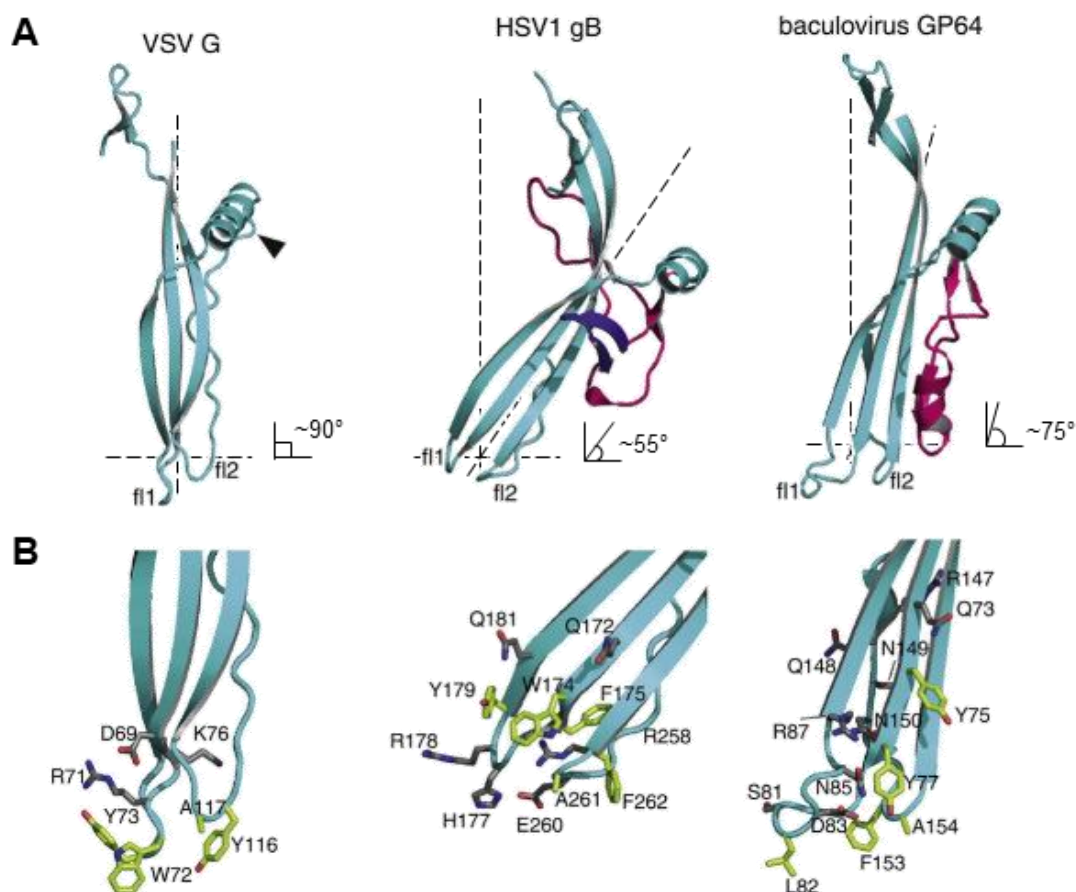
(**A**) Coupe de 6 Å de largeur du tomogramme d'une particule de VSV à haut pH (gauche, Zhou et al., 2022) et micrographie électronique représentative de la particule de VSV à pH 5,5 en coloration négative (droite, Libersou et al., 2010). (**B**) Densité moyennée issue des tomogrammes des trimères de VSV G à haut pH (gauche) et bas pH (droite). (**C&D**) Arrangement hexagonal des trimères de G dans les conformations pré- (C) et post-fusion (D) (Zhou et al., 2022). Les distances indiquées correspondent à la distance séparant l'axe de symétrie de deux trimères voisins. (**E**) Micrographie électronique du pseudotype VSV affichant MOKV G à sa surface à pH5,5 (Belot et al., 2019). (**F**) Structures tubulaires protéolipidiques formées après incubation des ectodomains de MOKV G (gauche, Belot et al., 2019) ou VSV G (droite, Libersou et al., 2010) en présence de liposome à pH 5,5.

### 3- Modalités d'interaction des boucles de fusion avec les membranes

Les glycoprotéines de classe III possèdent deux boucles de fusion (Baquero et al., 2015a). Comme chez les glycoprotéines de classe II, ces motifs hydrophobes sont localisés à l'extrémité du domaine FD, mais à la différence des glycoprotéines de classe II, ils ne sont pas masqués par une protéine chaperonne (Guardado-Clavo et Rey, 2021). Ces boucles sont systématiquement constituées par des résidus polaires aromatiques (W, Y) et des résidus chargés positivement à proximité (Roche et

al., 2008, Backovic et al., 2009). Les motifs définis pour la G des lyssavirus sont  $\{^{72}\text{FVGY}^{75}, ^{120}\text{WL}^{121}\}$  et pour celle des Vésiculovirus  $\{^{72}\text{WY}^{73}, ^{116}\text{WA}^{117}\}$  (**Figure 26**) (Roche et al., 2006, 2007, Sun et al., 2008). La présence des résidus chargés positivement empêche la pénétration en profondeur des membranes par ces boucles de fusion (**Figure 26**).

Dans la conformation pré-fusion de G, les boucles de fusion pointent vers la membrane virale (**Figure 26, Figure 32.B**). Au cours de la transition structurale de G, initiée par l'abaissement du pH dans l'endosome, elles sont projetées vers la membrane lipidique de l'endosome. Il est supposé que les résidus Y et W se positionnent à l'interface entre les têtes polaires chargées des lipides et leurs chaînes apolaires (Wimley and White, 1992, Maurer et al., 2013), ne déstabilisant alors que le feuillet externe des bicouches lipidiques. Cette interaction pourrait faciliter la formation d'une distorsion locale en forme de pointe (**Figure 26, Figure 32.B&C**) précurseur du *stalk* d'hémifusion (Efrat et al., 2007). Ce mécanisme d'interaction avec les membranes est différent de celui des peptides de fusion des classes I qui, eux, interagissent plus fortement avec les membranes (White et al., 2023).



**Figure 26. Organisation des boucles de fusion des glycoprotéines de classe III**

(A) Domaines de fusion des glycoprotéines de classe III. Les éléments structuraux conservés des glycoprotéines de classe III sont en cyan. Les insertions en tige-boucle (gB et GP64) sont en magenta et violet. Les deux boucles de fusion de chaque glycoprotéine sont indiquées (fl1 et fl2). (B) Zoom sur les boucles de fusion à la pointe des domaines de fusion. Les résidus démontrés comme essentiels à la fusion sont en vert, ceux chargés en gris. (D'après Baquero et al., 2015a)

#### **4- Interrupteurs sensibles au pH**

Plusieurs acides aminés jouant le rôle d'interrupteurs sensibles au pH lors de la transition structurale de VSV G et RABV G ont été identifiés (Roche et al., 2008, Gaudin et al., 2002).

##### **Interrupteurs permettant la transition de la forme pré- vers la forme post-fusion.**

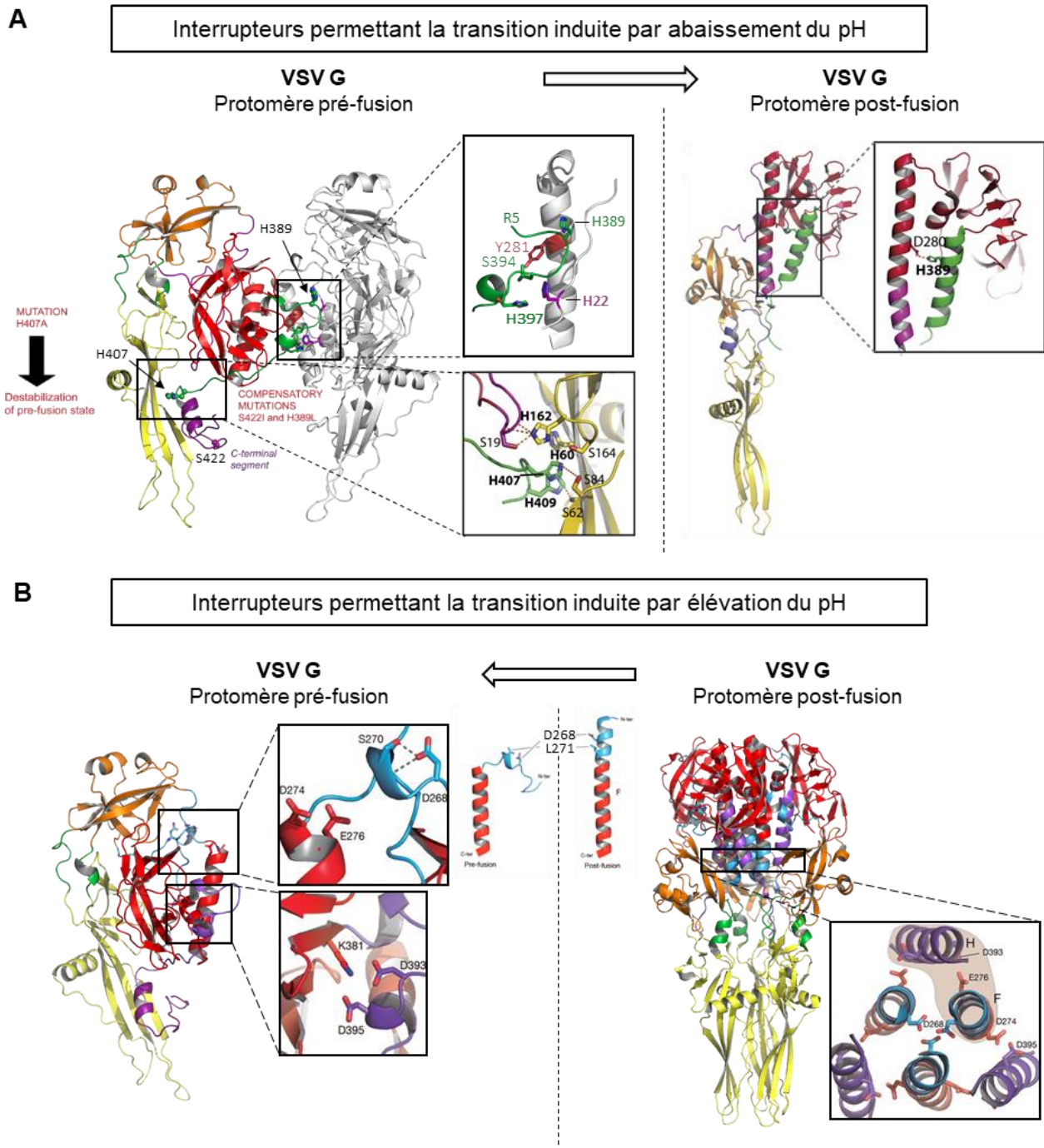
Chez les protéines de fusion virales sensibles au pH, les histidines sont proposées pour jouer un rôle clé comme interrupteurs sensibles au pH en raison de leur pKa proche du pH physiologique (~6) (Srivastava et al., 2007, Fritz et al., 2008, Wu et al., 2019). Chez les Rhabdovirus, un cluster conservé de 4 histidines (H60, H162, H407 et H409 chez VSV G) a été proposé comme interrupteur sensible au pH (Roche et al., 2007, Carneiro et al., 2003) (**Figure 27.A**). La protonation du cluster d'histidines entraîne la formation d'un cluster chargé positivement, ce qui pourrait engendrer une force répulsive entre le FD et le segment CTD de l'ectodomaine de VSV G initiant le changement de conformation (voir **II.C-6**). Seule H407 est conservée au-delà des Vésiculovirus (H397 chez les Lyssavirus, Belot et al., 2020, Yang et al., 2020, **Figure 28**). Son rôle clé d'interrupteur sensible au pH a été confirmé par mutagenèse (Beilstein et al., 2020). A pH neutre, la mutation H407A déstabilise l'état pré-fusion de VSV G (Beilstein et al., 2020) (**Figure 27.A**). Le passage du virus mutant portant cette mutation a permis la sélection de deux mutations compensatoires L396I et S422I localisées à distance du résidu 407.

##### **Interrupteurs permettant la transition de la forme post- vers la forme pré-fusion.**

Le trimère post-fusion de G contient des résidus acides enfouis au cœur du faisceau d'hélices constituant le domaine de trimérisation (**Figure 27.B**). Il a été proposé que leur déprotonation à haut pH déstabilise ce domaine central, permettant le repliement de G vers la conformation pré-fusion. Une approche par mutagenèse a confirmé le rôle clé de D268, accompagné par D274, D395 et D393, comme interrupteurs sensibles au pH permettant la réversibilité de la transition structurale (Ferlin et al., 2014) (**Figure 27.B**). La mutation D268L augmente la stabilité du trimère post-fusion (Ferlin et al., 2014). Une mutation compensatoire en position 271 (L271P), localisée dans le même segment R4 que D268, indique que la propension du segment 264-273 à se replier en hélice dans la conformation post-fusion est finement régulée (Ferlin et al., 2014) (**Figure 27.B**). Il a été montré que cet ensemble d'interrupteurs est légèrement différent chez CHAV G, faisant intervenir D269, E234 et H209 (Baquero et al., 2015b). De même, la mutation H270P permet de stabiliser le trimère pré-fusion de RABV G (Ng et al., 2020) (**Figure 28**).

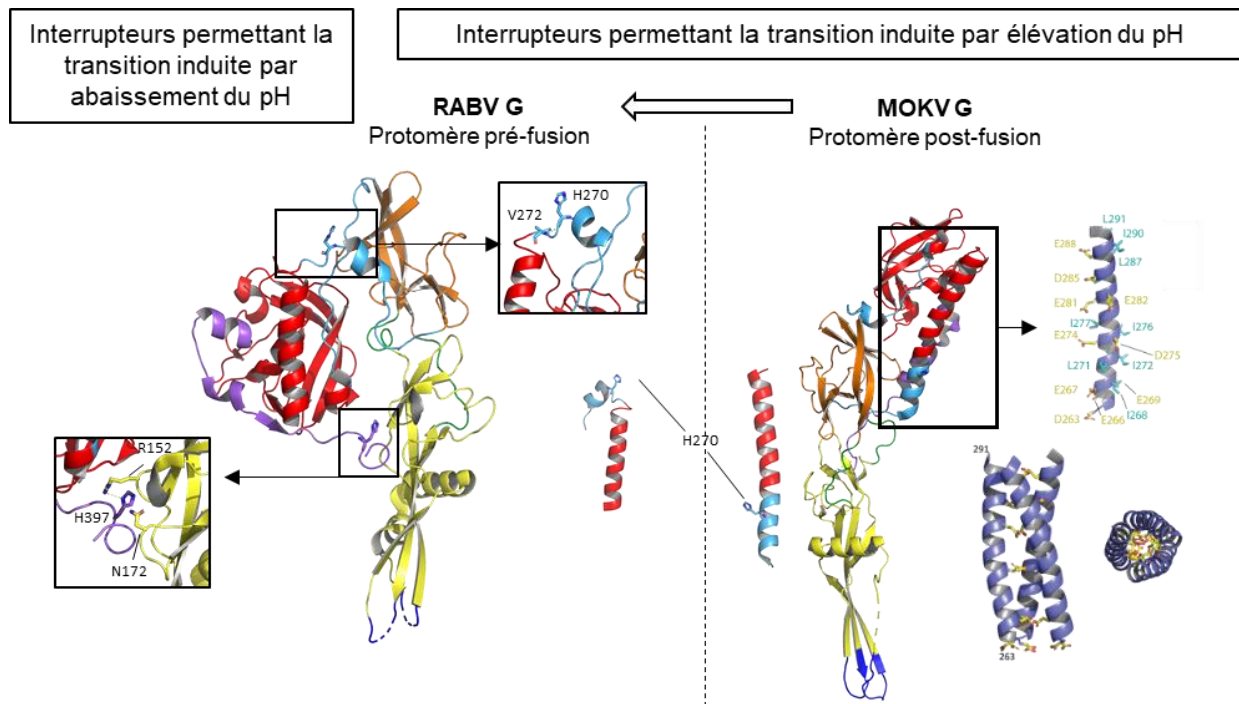
De façon similaire à ce qui est décrit chez VSV G, il existe chez les LYSV G un ensemble de résidus acides le long de l'hélice centrale du domaine de trimérisation, orientés vers l'intérieur du domaine de trimérisation dans la conformation post-fusion de G (Belot et al., 2020) (**Figure 28**). Dans

cette conformation, le calcul du pKa de ces résidus acides révèle une augmentation importante de leur valeur (Belot et al., 2020). Ces valeurs expliquent la stabilité du trimère post-fusion à pH 6,4. Elles expliquent aussi la forte coopérativité de la transition structurale induite à pH acide, la conformation post-fusion ayant une affinité plus élevée pour les ions H<sup>+</sup> (Roche et Gaudin, 2002).



**Figure 27. Interrupteurs moléculaires sensibles au pH chez VSV G**

**(A)** Interrupteurs moléculaires impliqués dans la transition structurale induite par l'abaissement du pH (Adapté de Beilstein et al., 2020). **(B)** Interrupteurs moléculaires impliqués dans la réversibilité de la transition structurale (élévation du pH) (Adapté de Ferlin et al., 2014).



**Figure 28. Interrupteurs moléculaires sensibles au pH chez G des Lyssavirus**

L'équivalent de H407 identifiée chez VSV est H397 chez RABV (Yang et al., 2020), un interrupteur moléculaire impliqué dans la transition structurale induite par l'abaissement du pH. La substitution H270P permet de stabiliser le trimère pré-fusion de RABV (PDB : 7u9g). La résolution de la structure cristalline de MOKV G (Belot et al., 2020, PDB : 6tmr) a mis en évidence la présence de nombreux résidus acides (jaunes) le long de l'hélice centrale du monomère. Ces résidus sont orientés sur la même face. La modélisation du centre du trimère post-fusion de MOKV G montre que les résidus acides sont orientés vers le centre du trimère post-fusion (*Adapté de Belot et al, 2020*).

## 5- Importance du domaine transmembranaire et du domaine proximal à la membrane lors du processus de fusion membranaire médiée par G

Dans cette partie, le rôle de la MPER (*Membrane Proximale External Region*) et du domaine transmembranaire (TMD) de RHABV G dans le processus de fusion membranaire est décrit. Il s'agit de domaines pour lesquels peu de données structurales et biologiques sont disponibles.

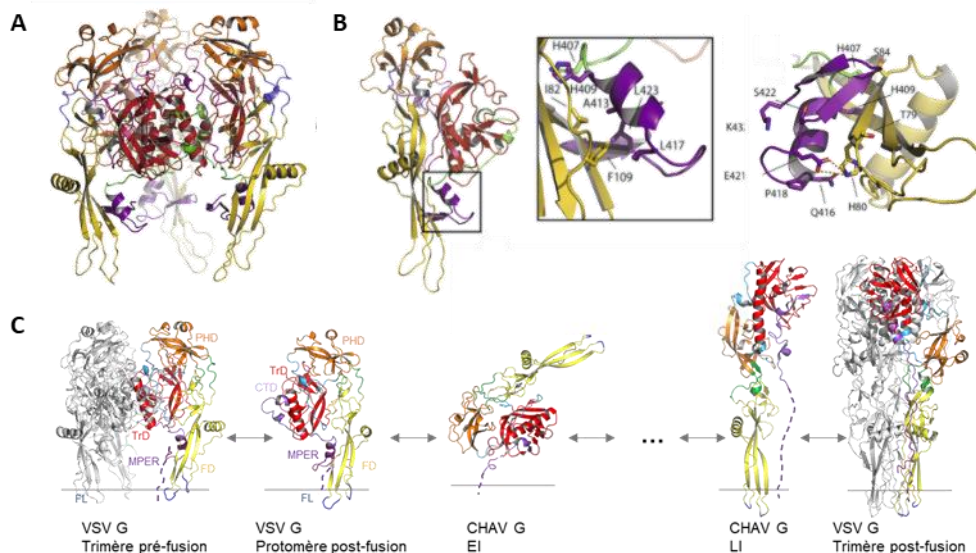
### a. Le segment C terminal de l'ectodomaine (CTD) et le domaine proximal à la membrane (MPER)

Le domaine proximal à la membrane (MPER) correspond au segment C terminal (CTD) de l'ectodomaine localisé juste en amont du domaine transmembranaire (TMD) (**Figure 23** Figure 23). Ce segment hydrophobe souvent riche en tryptophanes joue un rôle dans le processus de fusion membranaire. C'est un segment très conservé au sein des Vésiculovirus (Jeetendra et al., 2003), de même que chez les Lyssavirus (**Annexe 2**).

Le segment MPER a une capacité intrinsèque à modifier la topologie des membranes lipidiques (Robinson et Whitt, 2000, Jeetendra et al., 2002) à haut pH. Il peut induire le mélange de lipides

amenant à la formation d'un diaphragme d'hémifusion, réduisant ainsi la barrière énergétique de la fusion membranaire. Jeetendra et al., 2002, font l'hypothèse que des trimères de cette MPER de VSV G sont capables d'induire la courbure de la membrane, ce qui entrainerait la formation de distortions locales puis d'un *stalk* d'hémifusion (**Figure 16.A**). La diffusion latérale ultérieure des MPERs au niveau de la membrane pourrait aider à l'expansion du *stalk* vers le diaphragme d'hémifusion (Jeetendra et al., 2002). Ce mécanisme d'action est cependant encore loin d'être prouvé. Chez VSV G, une délétion des résidus <sup>433</sup>V-K<sup>446</sup> réduit drastiquement l'activité de fusion de VSV G (Jeetendra et al., 2002). La délétion de 9 (<sup>437</sup>L-W<sup>445</sup>) ou 13 résidus (<sup>433</sup>N-W<sup>445</sup>) abolit totalement l'activité de fusion de VSV G, ainsi que l'insertion de 9 ou 10 résidus supplémentaires en aval de la sérine 448 à la charnière entre la MPER et le TMD, ce qui indique que l'espacement entre la MPER du TMD est un paramètre important (Jeetendra et al., 2003). D'autre part, des expériences de mutagenèse et de délétion ont montré que le motif <sup>424</sup>FFGDTG<sup>429</sup> est nécessaire à la fusion médiée par VSV G (Jeetendra et al., 2002, 2003), tandis que les résidus conservés aromatiques (W441, F442 et W445) ne sont pas individuellement ni simultanément indispensables pour la fusion (Jeetendra et al., 2003).

Récemment, la structure pré-fusion de VSV G contenant une partie du segment CTD jusque-là non décrite (résidus 410 à 432) a été résolue (Beilstein et al., 2020). Dans cette structure, la MPER est repliée en une courte hélice  $\alpha$  transversale au domaine FD (**Figure 29**). Des interrupteurs sensibles au pH (H407 et H389-D280), décrits en **II.C-4**, confèrent la capacité au segment de maintenir G dans sa conformation pré-fusion par la formation d'un *cluster* hydrophobe (Beilstein et al., 2020) (**Figure 29**). Le groupement C-O de K432 est situé à ~2nm de la membrane. La MPER doit donc rejoindre directement la membrane, ce qui explique pourquoi la délétion de 13 acides aminés (433-445) réduit de façon dramatique l'activité de fusion de G (Jeetendra et al., 2003, Beilstein et al., 2020). La résolution de cette structure a permis de proposer un nouveau mécanisme de transition structurale qui rejoint celui proposé suite à la résolution de structures intermédiaires de la G du virus Chandipura (CHAV) (Baquero et al., 2017) (**Figure 29.C**). La transition structurale sur G serait initiée non pas par un mouvement du FD (Harison, 2015, Roche, 2007) mais par un réarrangement de la MPER (Baquero et al., 2017, Beilstein et al., 2020) (**Figure 29.C**). Comme la MPER interagit avec le FD, il est difficile d'envisager la relocalisation observée du FD au cours de la transition structurale sur G sans un changement de conformation de la MPER (Beilstein et al., 2020). Il est proposé que la MPER quitte en premier le sillon qu'elle occupe dans la conformation pré-fusion et se détache du FD avant tout autre changement de conformation (**Figure 29.C**). Ceci conférerait une mobilité au reste de l'ectodomaine et permet l'orientation des boucles de fusion vers la membrane cible (Beilstein et al., 2020).



**Figure 29. Structure cristalline de la MPER de VSV G à haut pH**

**(A)** Structure cristalline du trimère pré-fusion de VSV G (res 1-K442). Le segment I410-K432 est en violet. **(B)** Structure du segment 410-432. Les deux zooms détaillent l'organisation du segment et ses interactions avec le FD. (Extrait de Belstein et al., 2020) **(C)** Modèle de transition structurale de VSV G suite à l'abaissement du pH : dans ce modèle, c'est le réarrangement de la MPER qui quitte le sillon qu'elle occupe, ce qui initie le changement de conformation sur G.

#### **b. Le domaine transmembranaire (TMD)**

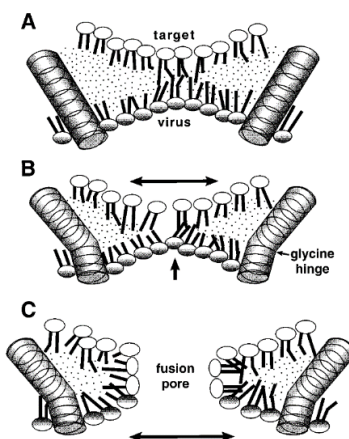
Il est proposé que le TMD joue un rôle après la formation du diaphragme d'hémifusion en permettant la formation et l'expansion du pore de fusion (Cleverley et al., 1998, Dennison et al., 2002, Ci et al., 2018), étape la plus coûteuse en énergie du processus de fusion (Cohen et Melikyan, 2004, Hernandez et Podbilewicz, 2017). Des expériences d'échange du TMD de VSV G avec le TMD de différentes protéines fusogènes ont montré que ces TMD ne sont pas équivalents. En effet, les chimères G-TMD<sub>GPI</sub>, G-TMD<sub>HA</sub> entraînent une abolition totale de l'activité de fusion de G chimérique, G-TMD<sub>SNARE</sub> une diminution de 30% de l'activité de fusion de G chimérique par rapport à G WT, tandis que G-TMD<sub>gB</sub> (HSV-1) n'affecte pas l'activité de fusion de G (Odell et al., 1997, Ci et al., 2018).

Des études par mutagenèse ont révélés le rôle crucial des glycines présentes au niveau du TMD. Les mutations G→A bloquent le processus de fusion à la formation du diaphragme d'hémifusion (Cleverley et al., 1998). Ces glycines sont conservées chez les Lyssavirus et les Vésiculovirus. Elles agissent comme des briseurs d'hélices dans un contexte membranaire : elles diminueraient l'hélicité du TMD et lui confèreraient un indice de déformabilité plus important, permettant au TMD d'explorer plus de conformations (Cleverley et al., 1998). La formation initiale de pore de fusion implique une courbure importante des membranes lipidiques (**Figure 30**). Si des courbures apparaissent à proximité des hélices du TMD (sous l'action de forces agissant ailleurs dans la protéine), le TMD de VSV G qui peut se courber pourrait mieux s'adapter à cet environnement qu'une hélice droite (**Figure 30**) (Cleverley et al., 1998, Dennison et al., 2002). Le regroupement de plusieurs TMD courbés sur les bords



du diaphragme d'hémifusion pourrait déstabiliser ce dernier et catalyser la formation du pore de fusion et son élargissement (**Figure 30**) (Cleverley et al., 1998, Dennison et al., 2002, Ci et al., 2018). En dehors des glycines, d'autres résidus ont été identifiés pour leur rôle coopératif important dans le processus de fusion, sans que le mécanisme en soit élucidé : L457, I458, F462 et V466 (Ci et al., 2018).

Il a été montré sur d'autres modèles biologiques qu'une coopération du TMD avec d'autres domaines de la protéine fusogène existe (Stein et al., 2009, Bao et al., 2016). Dans l'étude menée par Ci et al., 2018, l'effet inhibiteur le plus significatif est observé pour la chimère G-TMD<sub>HA</sub>. Le processus de fusion engendré par HA, glycoprotéine de classe I, est assez différent de celui proposé pour VSV G (voir **II-B.2.c**). Il fait intervenir un peptide de fusion, et non des boucles de fusion bipartites. L'incompatibilité entre G et le TMD de HA pourrait être expliquée par des modalités d'interaction et de coopération entre le TMD et le motif hydrophobe de G, différents entre les classes I et III. En revanche, l'échange du TMD de VSV G avec le TMD de gB de HSV-1 (classe III possédant aussi des boucles de fusion bipartites, cf. **II-C-3**) n'affecte pas l'activité de fusion de VSV G chimérique (Odell et al., 1997), ce qui renforce l'idée d'une coopération nécessaire entre le TMD et les boucles de fusion au cours des dernières étapes de fusion membranaire.



**Figure 30. Modèle montrant le rôle des glycines au niveau du TMD de VSV G pendant la fusion**

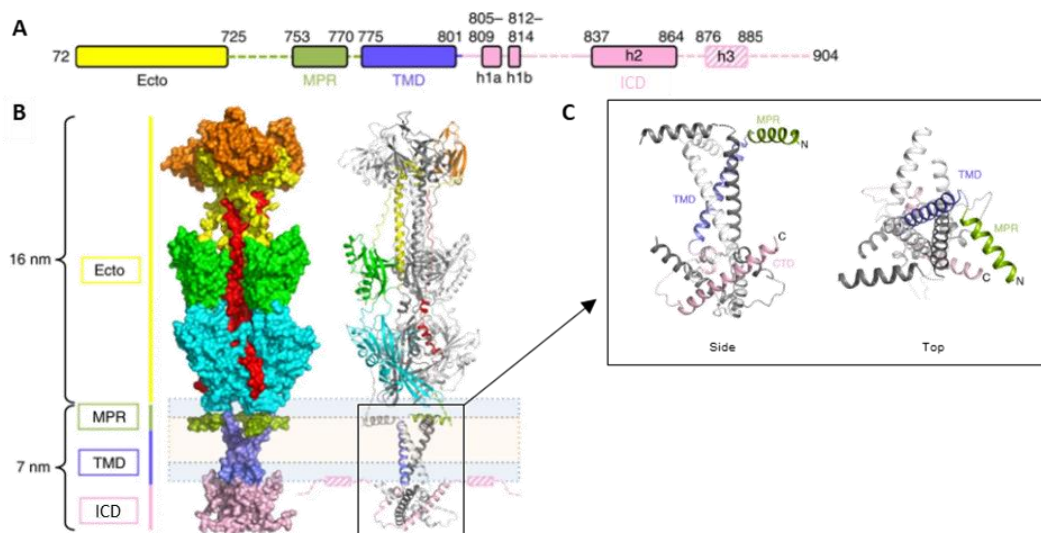
Extrait de Cleverley et al., 1998. **(A)** Les TMD sont ancrés dans la membrane virale par une hélice droite rigide et positionnés autour du diaphragme d'hémifusion (indique le sur la figure cercle rouge ou flèche). **(B)** Les hélices peuvent se courber au niveau de la « charnière » créée par la glycine. Cette courbure pourrait provoquer une compression du domaine du feuillet viral impliqué dans le diaphragme (bas) et l'étirement du feuillet de la membrane cible (haut) **(C)** Les lipides déstabilisés se réarrangent pour former un pore de fusion plus stable.

### c. Domaine intraviral (ICD) de G

Très peu de données sont disponibles sur ce segment de G chez les Vésiculovirus et les Lyssavirus. Les résultats sont globalement difficiles à interpréter parce que les altérations de ce domaine peuvent affecter la stabilité, l'expression en surface, la localisation dans la membrane et l'incorporation de G dans les virions. A la différence d'autres glycoprotéines virales, il a été montré que la palmitoylation de VSV G n'a pas d'impact sur sa localisation et son incorporation (Whitt et Rose, 1991). Les données les plus récentes concernant les glycoprotéines de classe III ont été apportées par la résolution de la structure complète de gB de HSV-1, qui présente un cas particulier probablement non extensible aux G de Vésiculovirus et Lyssavirus (Cooper et al., 2018) (**Figure 24**).

#### d. Structure entière de HSV-1 gB dans sa conformation post-fusion.

La structure trimérique complète de gB HSV-1 obtenue par cristallographie aux rayons X (Cooper et al., 2018) montre que la MPER, le TMD et le domaine intraviral s'organisent en piédestal à travers la membrane, l'ectodomaine reposant par-dessus (**Figure 31**). Dans cette conformation, la MPER de gB s'organise en hélices allongées à la surface de la membrane. Elle est séparée du TM par un segment riche en prolines et glycines qui contribuent certainement à la flexibilité de ce segment. Le TMD, lui, forme une hélice droite à travers la membrane, et les trois TMD du trimère définissant un tipi inversé dans la membrane (**Figure 31**). Les TMDs se croisent avec un angle de  $\sim 46^\circ$ . La partie C terminale des TMDs, reliée au domaine intraviral, sont stabilisés par un motif *knob-and-hole* (**Figure 31.C**). Les résidus de ce segment participent certainement aux interactions hydrophiles avec le domaine intraviral. Ce domaine intraviral est organisé en hélices suivies d'un domaine C terminal non défini structuralement mais proposé pour interagir avec la face interne de la membrane virale (**Figure 31**). C'est là une différence importante avec VSV G : à la différence de VSV G pour laquelle la MPER permet la stabilisation du trimère pré-fusion (Beilstein et al., 2020), dans le cas de la gB de HSV-1 ce serait le domaine intraviral qui stabiliserait gB dans sa conformation pré-fusion (Cooper et al., 2018). Il est peut probable que le domaine ICD des Vésiculovirus et des Lyssavirus partage une organisation commune avec celui de gB de HSV-1. Effectivement, le domaine intraviral des Vésiculovirus et Lyssavirus est beaucoup plus court que celui de gB de HSV-1 (30 aa contre 67 aa).



**Figure 31. Structure trimérique post-fusion complète de la gB de HSV-1 et rôle putatif du domaine intraviral**

(A) Diagramme de gB. Les structures non résolues sont représentées en hachures. L'hélice H3, déterminée par ESR, est identifiée. TMD : domaine transmembranaire (violet), MPER : membrane proximal external region (vert), Ecto : ectodomaine (jaune), hx : hélices du domaine intraviral (rose). (B) Structure résolue par cristallographie aux rayons X, en surface (gauche) et cartoon (droite). Seul un protomère est coloré à droite. La membrane est représentée schématiquement (têtes lipidiques hydrophiles en bleu, cœur hydrophobique en orange pale). (C) Zoom sur la structure en piédestal du segment MPER-TMD-ICD en vue latérale (gauche) et du dessus (droite). La structure en vue inversée formée par les hélices du TM est visible. (D'après Cooper et al., 2018)

## 6- Intermédiaires de G durant la transition structurale

Le changement de conformation qui permet le passage de la forme trimérique pré-fusion à la forme trimérique post-fusion de VSV G implique d'importants repositionnements des domaines structuraux de G les uns par rapport aux autres et sont permis par la réorganisation des segments flexibles qui les relie (Figure 32).

### Des intermédiaires monomériques

Plusieurs travaux basés sur des expériences biophysiques complétées par des analyses de G à la surface de particules virales par microscopie électronique ont mis en évidence l'existence d'intermédiaires monomériques de G chez VSV et le Vésiculovirus Chandipura (CHAV) (Albertini et al., 2012, Crimmins et al., 1983, Doms et al., 1987, Libersou et al., 2010, Baquero et al., 2017).

G existe sous plusieurs formes à la surface des particules virales (Gaudin et al., 1992, Libersou et al., 2010, Zhou et al., 2022) (Figure 32.A). A pH 7, à la surface des virions, les spicules de G sont sous conformation pré-fusion et forment une couche homogène de 8 nm d'épaisseur à la surface de la particule virale (Roche et al., 2007, Libersou et al., 2010, Albertini et al., 2012) (Figure 32.A). A la surface des particules, quelques trimères peuvent être observés (éventuellement organisés en réseau (Zhou et al., 2022)), mais la majorité des G adoptent une variété de conformations monomériques pré-fusion (Libersou et al. 2010, Albertini et al., 2012, Zhou et al., 2022). Les expériences de SAXS indiquent la présence de plusieurs espèces monomériques de G en équilibre, ce qui suggère une flexibilité importante de la protéine (Albertini et al., 2012) (Figure 32.A). Plus le pH est bas, plus l'équilibre entre les différentes conformations de ces monomères est déplacé vers des conformations allongées dites intermédiaires (Albertini et al., 2012). A pH intermédiaire (inférieur à 6.4), les spicules mesurent 11,5 nm de long : G adopte des conformations plus allongées, monomériques et obliques par rapport à la membrane virale (Gaudin et al., 1993, Albertini et al., 2012, Libersou et al., 2010) (Figure 32.A). Certaines des formes monomériques de G observées sont capables d'interagir avec des membranes cibles via leurs boucles de fusion (Albertini et al., 2012). L'apparition séquentielle de ces espèces monomériques avec l'abaissement du pH renforce l'idée que le changement de conformation de VSV G nécessite des intermédiaires monomériques. A pH inférieur à 6,4, la principale forme détectée correspond au trimère post-fusion de G. La présence d'un réseau hélicoïdal de G sous la conformation post-fusion à la surface de la particule virale est observée à pH 5.5 (voir II-C-2) (Albertini et al., 2012, Libersou et al., 2010, Zhou et al., 2022).

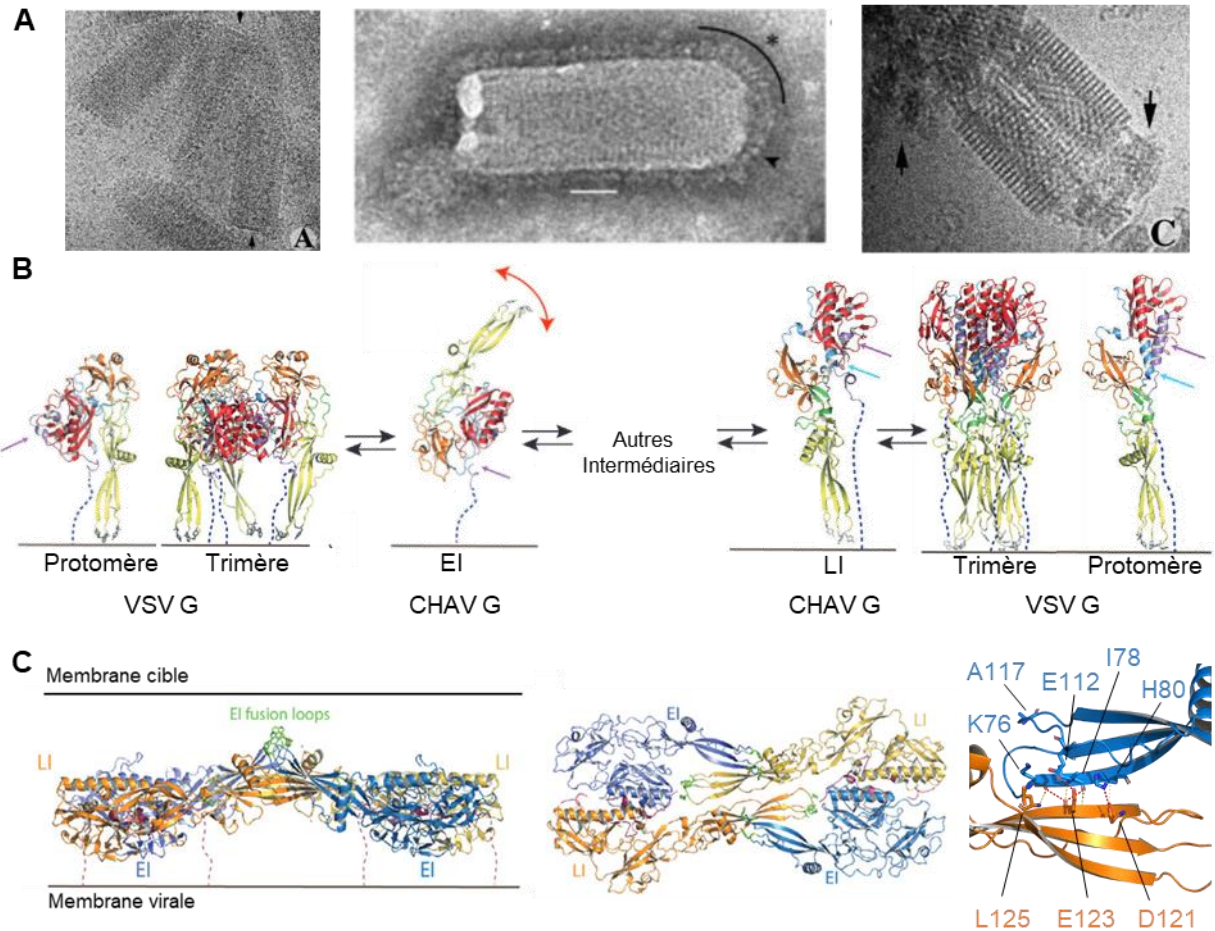
Deux structures d'intermédiaires monomériques de CHAV G ont été résolues par cristallographie aux rayons X (Baquero et al., 2017) (Figure 32.B). En fonction de la présence de motifs identitaires caractéristiques des formes pré et post-fusion de G, ces deux intermédiaires sont appelés

précoce et tardif (**Figure 32.B**). Les structures résolues permettent de définir l'ordre des événements permettant le changement de conformation de G (Baquero et al., 2017). La libération du segment R5 reliant l'ectodomaine au domaine transmembranaire (état précoce, EI « *early intermediate* ») est suivi de l'allongement de l'hélice du domaine de trimérisation (état tardif, LI « *late intermediate* ») (**Figure 32.C**). Enfin, la transition de l'état LI à la conformation post-fusion est caractérisée par le repliement de la partie C-terminale en hélice concomitant à la trimérisation (**Figure 32.B**) (Baquero et al., 2017).

### **Des intermédiaires dimériques ?**

Les structures des intermédiaires EI et LI de CHAV G ont été déterminées à partir d'un seul cristal (Baquero et al., 2017) dont l'unité asymétrique contenait quatre molécules de CHAV G assemblées selon un axe 2 non cristallographique. Ces protomères présentent deux conformations distinctes : deux intermédiaires EI et deux intermédiaires LI qui s'associent pour former un assemblage antiparallèle tétramérique plat dans lequel les boucles de fusion sont rassemblées et créent un patch hydrophobe (**Figure 32.C**). Si cet arrangement venait effectivement à se former à la surface des virions, l'orientation de ce patch serait optimale pour attaquer la membrane cible au début du processus de fusion (Baquero et al., 2017) **Figure 32.B&C**.

Des études par mutagenèse viennent soutenir la pertinence de cette structure dans le processus de fusion membranaire médié par la G des Vésiculovirus. Effectivement, la mutation de résidus dans la zone d'interaction entre les FD de deux protomères différents (D121, E123 et K76 en particulier) affecte significativement la capacité de G à fusionner (**Figure 32.C**) (Fredericksen et Whitt, 1996, Gaudin et al., 1999, Stanifer et al., 2011)



**Figure 32. G adopte des conformations intermédiaires au cours de sa transition**

**(A)** Organisation de G à la surface des particules de VSV à pH 7 (gauche) où G est sous forme pré-fusion, à pH 6,7 (milieu) où G adopte une conformation allongée monomérique et à pH 5,5 (droite) où G est sous forme trimérique post-fusion (Libersou et al., 2014, Albertini et al., 2012). **(B)** Modèle proposé du changement de conformation de G des Vésiculovirus. Le code couleur est le même que présenté en **Figure 21**. Les trimères pré-fusion de G se dissocient en monomères. Le segment R5 (flèche violette) quitte le sillon qu'il occupe pour former l'état intermédiaire précoce EI. Le repliement des autres régions flexibles de G (R1-R4) conduit à l'état intermédiaire tardif (LI). Le repliement final des segments R1&4 (flèche bleue) et de R5 (flèche violette) conduisent à l'état post-fusion final de G. **(C)** Assemblage tétramérique observé dans le cristal de CHAV G (vue du dessus à gauche, vue latérale au milieu). Chaque protomère est dans une couleur différente (bleus pour les états EI, jaune-orange pour les états LI) (Baquero et al., 2017). Le segment reliant l'ectodomaine de G au domaine transmembranaire est en pointillés. Les contacts latéraux entre les intermédiaires EI et LI (droite) font notamment intervenir les résidus E123, D121 et K76.

# III. Antigénicité des Rhabdovirus

## A. Pourquoi s'y intéresser ?

Comme présenté précédemment, G est le seul antigène viral exposé à la surface des particules virales. De ce fait, G constitue la cible principale de la réponse immune humorale de l'hôte.

Comme exposé **en I-B**, la glycoprotéine G de la souche virale VSV Indiana (VSVI) est la glycoprotéine de référence pour le pseudotypage de lentivirus. Utilisés de façon presque exclusive grâce à leur versatilité, les vecteurs pseudotypés avec VSV G présentent un fort potentiel pour les thérapies géniques et émergent également comme des outils intéressants en oncothérapie. Cependant, plusieurs limites restent présentes quant à l'utilisation de ces vecteurs. Notamment, VSV G est fortement immunogène (Scher et Schnell, 2020). La réponse humorale provoquée par VSV G induit la production d'anticorps fortement neutralisants et les vecteurs lentiviraux pseudotypés par VSV G peuvent être inactivés par des IgM naïfs et le complément présent dans les sérums humains non immunisés (Tesfay et al., 2014, DePolo et al., 2000). Ceci affecte directement l'efficacité des traitements reposant sur l'utilisation de VSV G. Étonnamment, en parallèle de l'engouement pour l'utilisation de VSV G comme outil biotechnologique et d'une meilleure compréhension de la biologie de VSV, il existe peu de données sur les bases moléculaires et structurales de la neutralisation de VSV, et plus largement des Vésiculovirus, par des anticorps.

Améliorer notre compréhension des mécanismes de neutralisation de VSV et d'autres Vésiculovirus par des anticorps dirigés contre G pourrait nous permettre une meilleure compréhension des interactions hôtes-pathogènes et de la coévolution de ces protéines (Munis et al., 2018). Ces informations sont également nécessaires pour pouvoir modifier de façon rationnelle G dans le cadre de développement d'oncothérapies, de vecteurs vaccinaux basés sur G (Bishnoi et al., 2018, Sadelin et al., 2017, Scher et Schnell, 2020) et éventuellement de traitements préventifs ou curatifs contre les maladies vétérinaires causées par ces agents et dont le poids économique en élevage est important (Sheperd et al., 2023).

Dans le cas des Lyssavirus, comme vu **en I-C**, les traitements actuellement disponibles ne confèrent qu'une protection limitée contre les LYSV autres que RABV (Weyer et al., 2008, De benedictis et al., 2016, Chao et al., 2017, Kim et al., 2021, Liu et al., 2013). L'émergence récurrente de ces derniers (Aréchiga Ceballos et al., 2013, Hu et al., 2018, Nokireki et al., 2018) et la potentielle adaptation de plusieurs d'entre eux à de nouveaux réservoirs du fait de contacts favorisés entre faune sauvage et

animaux domestiques liés aux changements environnementaux rappelle la nécessité de développer des traitements à plus large spectre, protégeant également contre les Lyssavirus plus divergents. D'autre part, les infections causés par ces LYSV ne sont pas distinguables de celles causées par RABV et le diagnostic différentiel reste peu accessible (Evans et al., 2012, WHO, 2018a).

L'obtention de structures de LYSV G est donc nécessaire à la conception rationnelle de molécules les ciblant. Récemment, les structures pré-fusion de RABV G et post-fusion de MOKV G ont été résolues (Yang et al., 2020 ; Belot et al., 2020), soient des Lyssavirus des phylogroupes I et II. L'obtention de structures de G de Lyssavirus plus divergents permettrait de compléter le panel déjà existant et par la suite la conception rationnelle de molécules dirigées contre les LYSV G, en particulier d'anticorps monoclonaux (mAbs), dont le développement s'est progressivement imposé comme alternative aux immunoglobulines anti-rabiques (RIGs) (de Melo et al., 2022, WHO, 2018b, Sparrow et al., 2019,).

## **B. Antigénicité de VSV et RABV**

### **1- Épitopes de neutralisation de VSV G**

Au sein des Vésiculovirus, l'antigénicité de G est actuellement la mieux caractérisée sur le sérotype Indiana (VSVI), en particulier sur la souche VSVI Mudd Summer (VSVI MS) (Lefrançois et Lyles, 1982a, Lefrançois et Lyles, 1983, Vandepol et al., 1986, Munis et al., 2018).

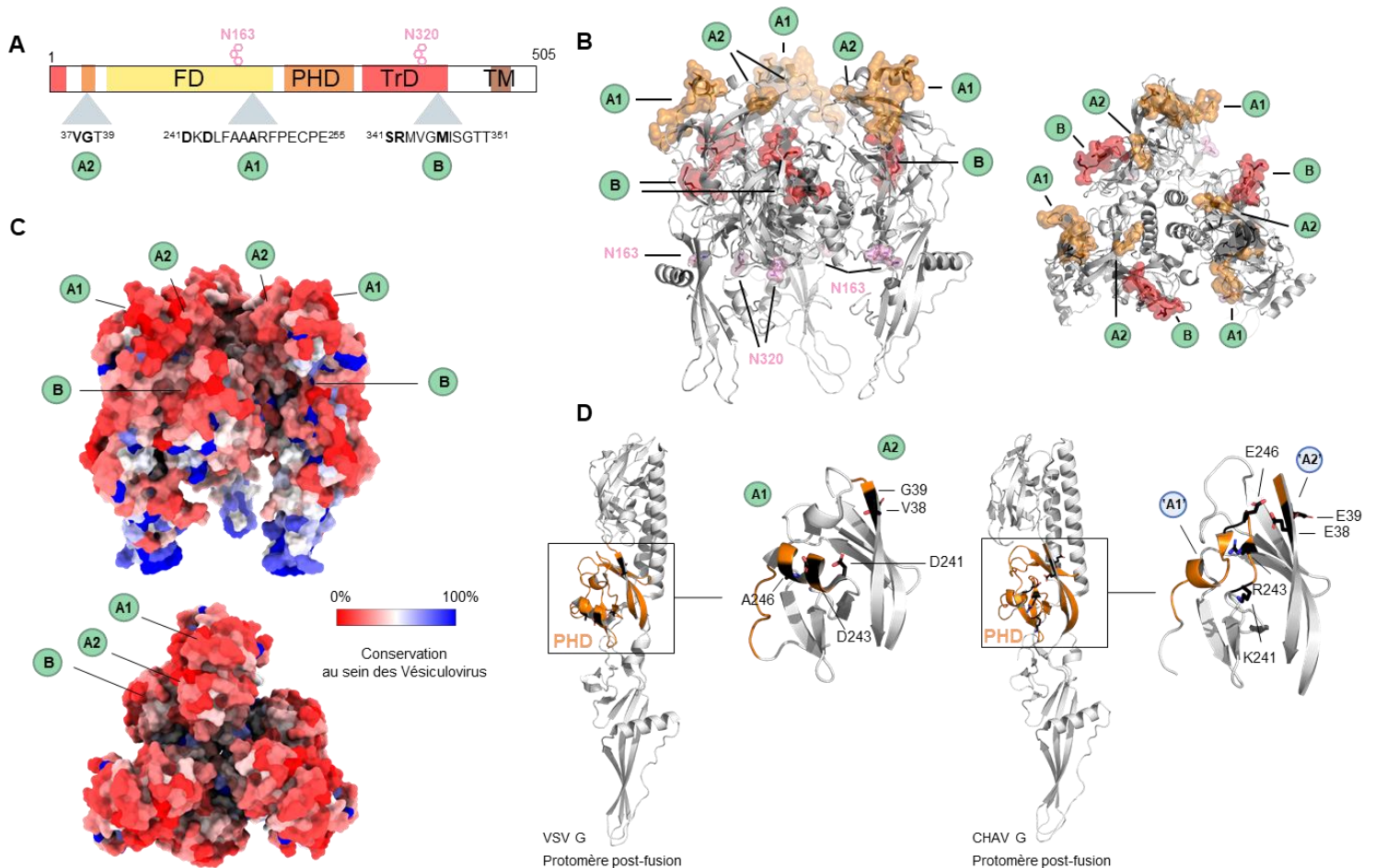
Trois sites antigéniques majeurs ont été cartographiés sur l'ectodomaine de VSVI Mudd Summer par des tests de neutralisation de bibliothèques de mAbs et par identification de mutants d'échappement (Lefrançois et Lyles, 1982,1983) : A1, A2 et B.

Le site antigénique A1 correspond à un épitope structural localisé au niveau du domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD) et défini par les résidus 241-255 (**Figure 33**) (Lefrançois et Lyles, 1982, Lefrançois et Lyles, 1983, Vandepol et al., 1986). Les mutants d'échappement identifiés contre le mAb I8 D241Y/N, D243N et A246E indiquent le rôle clé de ces résidus dans la neutralisation de VSVI par des anticorps ciblant cet épitope (Vandepol et al., 1986).

Le site antigénique A2 est constitué par un épitope linéaire aussi localisé au niveau du PHD et défini par les résidus 37-39 (**Figure 33**) (Lefrançois et Lyles, 1982, Lefrançois et Lyles, 1983, Vandepol et al., 1986). De façon similaire, les mutants d'échappement sélectionnés contre les mAbs I2 (V38A/I) et I3 (G39S/D) mettent en évidence le rôle clé de ces résidus (Vandepol et al., 1986).

Le site antigénique B comprend un épitope structural défini par les résidus 341-351 portés par le domaine de trimérisation (TrD) (**Figure 33**) (Lefrançois et Lyles, 1982, Lefrançois et Lyles, 1983, Vandepol et al., 1986). Les mutants d'échappement de VSVI MS sélectionnés contre le mAb I14 (S341P, R342S, M346T) identifient ces résidus clés (Vandepol et al., 1986). A la différence des sites A1 et A2, le site antigénique B est conservé au sein des Vésiculovirus mais aussi des Lyssavirus : il est retrouvé chez le sérotype New Jersey (Luo et al., 1988, Vandepol et al., 1986) et l'homologue du site antigénique III de RABV (Seif et al., 1985) (voir **partie suivante**) (**Figure 33**).

Deux des trois sites antigéniques majeurs de VSV G sont localisés sur le domaine PHD (**Figure 33**). Or le PHD est le domaine structural le plus divergent au sein des Vésiculovirus, au niveau de la séquence en acide aminés (voir **Annexe 1**), mais également structurellement (**Figure 33.D**). Effectivement, lorsque l'on compare les PHD de VSV G et de G du virus Chandipura (CHAV), l'organisation des sites antigéniques A1 et A2 diffèrent aussi bien au niveau des résidus qui les composent que de leur organisation structurale (**Figure 33.D**) (Roche et al., 2006, Baquero et al., 2017). En particulier, le site A1 se situe au niveau d'une hélice  $\alpha$  chez VSV G, tandis que ce segment ne présente pas de structure secondaire chez CHAV G (**Figure 33.D**) (Roche et al., 2006, Baquero et al., 2015b). L'épitope structural n'est donc pas conservé.





### Figure 33. Sites antigéniques de VSV G

**(A)** Positions et séquences des sites antigéniques majeurs de VSV G (après clivage du signal peptidique). Les N-glycosylations sont indiquées en rose, les résidus clés en gras. **(B)** Localisation des sites antigéniques A1, A2 et B sur le trimère pré-fusion de VSV G en vue latérale (gauche) et vue du dessus (droite). A1 et A2, localisés sur le PHD de VSV G, sont en orange, le site B, localisé sur le TrD, en rouge. Les chaînes latérales des résidus clés de ces sites antigéniques sont en noir (résidus en gras en A). Les chaînes latérales des asparagines qui portent les glycosylations de VSV G sont indiquées en rose. **(C)** Conservation de la surface du trimère pré-fusion de G au sein des 21 espèces de Vésiculovirus (réalisé avec ChimeraX). Les régions conservées sont en bleu, les moins conservées en rouge. **(D)** Comparaison de l'organisation du PHD de VSV G et de CHAV G. Les sites A1 et A2, en orange sur les zooms, sont transposés sur CHAV G ('A1' et 'A12', en bleu). Les résidus clés des sites A1 et A2 chez VSV sont en noirs : pour les mêmes positions, les acides aminés clés de ces sites A1 et A2 (chaînes latérales en noires) sont différents sur CHAV G. (PDB : 6tit, 4d6w).

## 2- Épitopes de neutralisation de RABV G

Au sein des Lyssavirus, l'antigénicité de la G la mieux caractérisée est celle de RABV G. Quatre sites antigéniques majeurs et un site antigénique mineur ont été identifiés sur l'ectodomaine de RABV G par analyses antigéniques comparatives utilisant des bibliothèques de mAbs et par identification de mutants d'échappement : I, II, III, IV et a (Benmansour et al., 1991, Lafon et al., 1983, Lafon et al., 1984, Prehaud et al., 1988, Raux et al., 1995, Seif et al., 1985).

Le site antigénique I comprend un épitope linéaire conservé localisé au niveau du PHD de G et défini par les résidus 226-231 (Marissen et al., 2005) (**Figure 34**). Le résidu L231 semble jouer un rôle clé dans la reconnaissance de cet épitope par des mAbs : un mutant d'échappement de la souche RABV ERA (Evelyn Rokitnicki Abelseth) présentant la substitution L231P a été sélectionnée contre le mAb M275 (Fallahi et al., 2016) tandis que la G de deux autres souches de RABV, BBBV et SHBV, qui présentent une proline en position 231 (P231) ne lient pas le mAb M275 (Fallahi et al., 2016).

Le site antigénique II est un épitope structural discontinu comprenant deux régions distinctes, constituées par les acides aminés 34-42 (IIa) et 198-200 (IIb), reliées entre elles par un pont disulfure (cystéines 35 et 189) (Benmansour et al., 1991, Prehaud et al., 1988). Ce site est aussi localisé sur le PHD de G et est très conservé entre les différentes souches de RABV, mais l'est beaucoup moins entre les différents phylogroupes (**Figure 34**).

Le site antigénique III correspond à un épitope structural localisé sur le TrD de G et composé des acides aminés 330-338, parmi lesquels les résidus 330, 333, 336 et 338 sont critiques (Benmansour et al., 1991, Seif et al., 1985, Tuffereau et al., 1989, Fallahi et al., 2016) (**Figure 34**). Ce site antigénique est critique dans la pathologie de RABV (Coulon et al., 1998). Les mutants K330D et R333M perdent leur infectiosité chez les souris adultes (Coulon et al., 1998). En particulier, lorsque R333 de la souche CVS de RABV est substituée (par L, I, M, C ou S), les mutants antigéniques sont avirulents (Tuffereau et

al., 1989). En revanche, R333K permet de maintenir cette virulence (Tuffereau et al., 1989). D'ailleurs, plusieurs virus révertants, isolés à partir de virus avirulents (mutation en position 333) présentent cette lysine en position 333 (Tuffereau et al., 1989). Il semble donc que la présence d'un acide aminé chargé positivement en position 333 sur G soit nécessaire à la virulence de RABV (Tuffereau et al., 1989). Il est également supposé que ces résidus soient également nécessaires à la reconnaissance par RABV de son potentiel récepteur cellulaire p75NTR (Tuffereau et al., 1998).

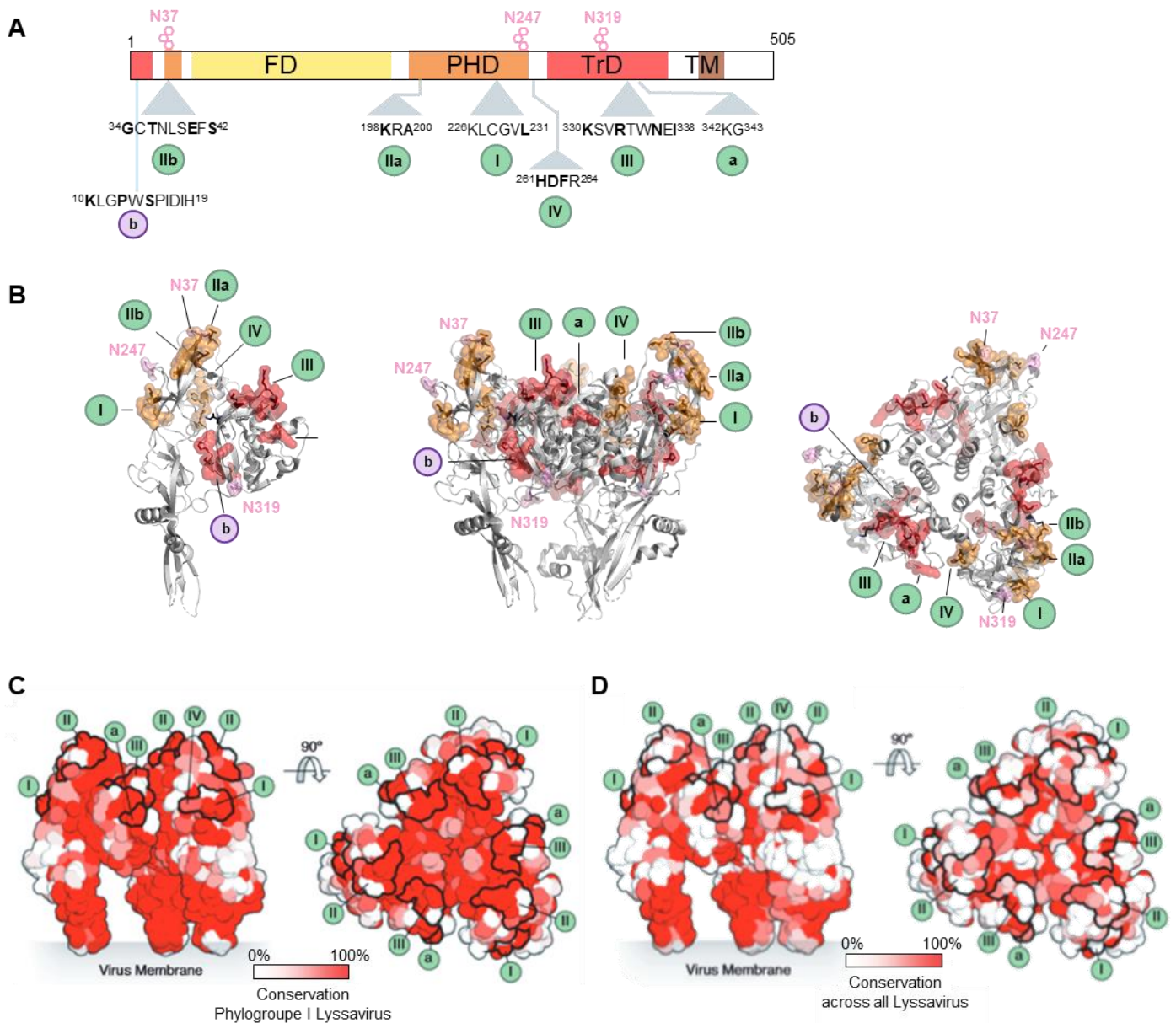
Le site antigénique IV, aussi appelé G5, correspond à un épitope linéaire localisé sur le PHD et composé des résidu 261-264 (**Figure 34**). En particulier, le motif <sup>261</sup>HDF<sup>263</sup> est critique pour la reconnaissance de cet épitope par des mAbs neutralisants (Bunschoten et al., 1989, Dietzschold et al., 1990, van der Heijden et al., 1993, Cai et al., 2010). Cet épitope est conservé au sein du phylogroupe I mais pas du phylogroupe II (**Figure 34**).

Le site antigénique mineur « a » est composé des résidus <sup>342</sup>KG<sup>343</sup> et est localisé sur le TrD, à proximité du site antigénique III (Benmansour et al., 1991) (**Figure 34**).

Un nombre restreint de mAbs ne reconnaissent que la conformation post-fusion de RABV G à la surface de particules virales (Raux et al., 1995, Gaudin et al., 1996). Leur épitope est localisé dans la partie N terminale du TrD, en particulier aux positions 10, 13 et 15 (Raux et al., 1995, Gaudin et al., 1996), localisées à proximité de la surface lorsque G est dans sa conformation post-fusion (**Figure 34**).

Bien que les sites antigéniques II et III soient éloignés sur RABV G, les mAbs ciblant ces sites sont en compétition pour se lier à G (Lafon et al., 1983). La neutralisation des LYSV G du phylogroupe I reposerait davantage sur des mAbs ciblant les sites antigéniques I et III, tandis que la neutralisation des LYSV G du phylogroupe II dépendrait d'avantage du site antigénique II (Evans et al., 2018). Effectivement, les anticorps neutralisants isolés chez des humains vaccinés contre RABV réagissent préférentiellement avec les sites antigéniques I et III (De Benedictis et al., 2016).

Enfin, les mAbs neutralisant dirigés contre RABV G reconnaissent essentiellement la conformation pré-fusion de G (notamment les mAbs ciblant les sites antigéniques II et III) (Gaudin, 1996) mais certains, capables de reconnaître la forme post-fusion de G peuvent également être neutralisants (Raux et al., 1995).



**Figure 34. Sites antigéniques de RABV G**

**(A)** Positions et séquences des sites antigéniques majeurs I, IIa et IIb, III, IV et le site mineur a de RABV G (après clivage du signal peptide). Les N-glycosylations sont indiquées en rose, les résidus clés en gras. Un épitope de neutralisation de RABV G à bas pH est également identifié (b). **(B)** Localisation des sites antigéniques I, IIa et IIb, III, IV, a sur le protomère pré-fusion de RABV G (en orange les sites localisés sur le PHD, en rouge sur le TrD) ainsi que les épitopes isolés b, c, d (en bleu) et e (en vert). La localisation de ces sites antigéniques sur le trimère pré-fusion de RABV G (vue latérale, gauche, vue du dessus, droite). Les chaînes latérales des asparagines qui portent les glycosylations de VSV G sont indiquées en rose. (PHD : 7u9g) **(C)** Conservation de la surface du trimère pré-fusion de G au sein du phylogroupe I. **(D)** Conservation de la surface du trimère pré-fusion de G au sein des 18 Lyssavirus. Les gradients de conservation sont réalisés avec ESPript3 (Robert et Gouet, 2014). **(C&D)** : extraits De Melo et al., 2022).

## **C. Concepts sur la neutralisation des virus par les anticorps**

### **1- Un problème de définition**

Initialement, le terme de « neutralisation » médiée par les anticorps se définit comme la capacité d'un anticorps (Ab) à prévenir l'infection d'une cellule en l'absence d'autres facteurs, et suppose l'attachement de l'anticorps à la particule virale au cours de l'étape d'entrée (Klasse, 2014).

Cependant, le terme « neutralisation » peut aussi être employé plus largement pour décrire les propriétés antivirales des anticorps, comme la protection *in vivo* contre l'infection qui peut reposer ou non sur la fonction effectrice de neutralisation (telle que définie au-dessus et en III-C.3).

Dans la suite du manuscrit, c'est à cette première définition que nous ferons référence.

### **2- Anticorps polyclonaux vs. monoclonaux**

Depuis le développement des premiers anticorps monoclonaux (mAbs) par Köhler et Milstein en 1975 (Prix Nobel, 1984), cette technologie n'a cessé de prendre de l'essor (Marshall et al., 2017).

A la différence des anticorps polyclonaux qui contiennent un mélange hétérogène d'IgG dirigé contre un antigène dans sa globalité (plusieurs épitopes reconnus), les mAbs sont des anticorps monospécifiques produits en laboratoire, initialement à partir d'hybridomes (Köhler et Milstein, 1975). Un hybridome est la cellule issue de la fusion de lymphocytes B préalablement exposés à l'antigène d'intérêt avec des cellules de myélomes immortalisées. Un hybridome possède ainsi la capacité de produire des mAbs de façon stable et reproductible dans le temps (Köhler et Milstein, 1975).

Dans le cadre du développement de traitements thérapeutiques, ou bien même pour l'étude antigénique d'une cible, les mAbs présentent un avantage considérable sur les anticorps polyclonaux. Ils peuvent notamment être produits en grande quantité, leur production est reproductible (homogénéité des batchs produits) et ils sont également plus faciles à modifier et à designer. Surtout, leur monospécificité est associée à une faible réactivité croisée, ce qui permet une étude facilitée de leur propriétés de neutralisation de l'antigène ciblé. C'est pourquoi, même dans la conception de vaccins, ces anticorps sont devenus la norme.

Dans la suite du manuscrit, la mention d'anticorps fera exclusivement référence à des anticorps monoclonaux.

### 3- Les fonctions effectrices des anticorps

Les anticorps neutralisants (nAbs) sont de plus en plus utilisés comme agents antiviraux passifs thérapeutiques et prophylactiques et dans la conception de vaccins antiviraux. *In vivo*, les nAbs peuvent exercer leurs fonctions antivirales en suivant deux types de fonctions : (1) une neutralisation directe qui repose sur une fonction effectrice dite « neutralisation », (2) une neutralisation indirecte, qui repose sur des fonctions effectrices dépendantes du fragment Fc des anticorps (**Figure 37**). Un bref aperçu de ces fonctions effectrices est proposé ci-dessous (revues dans Klasse, 2014, Burton, 2023), avec un focus autour des informations concernant les LYSV et les Vésiculovirus lorsqu'elles sont disponibles.

#### La fonction effectrice de neutralisation

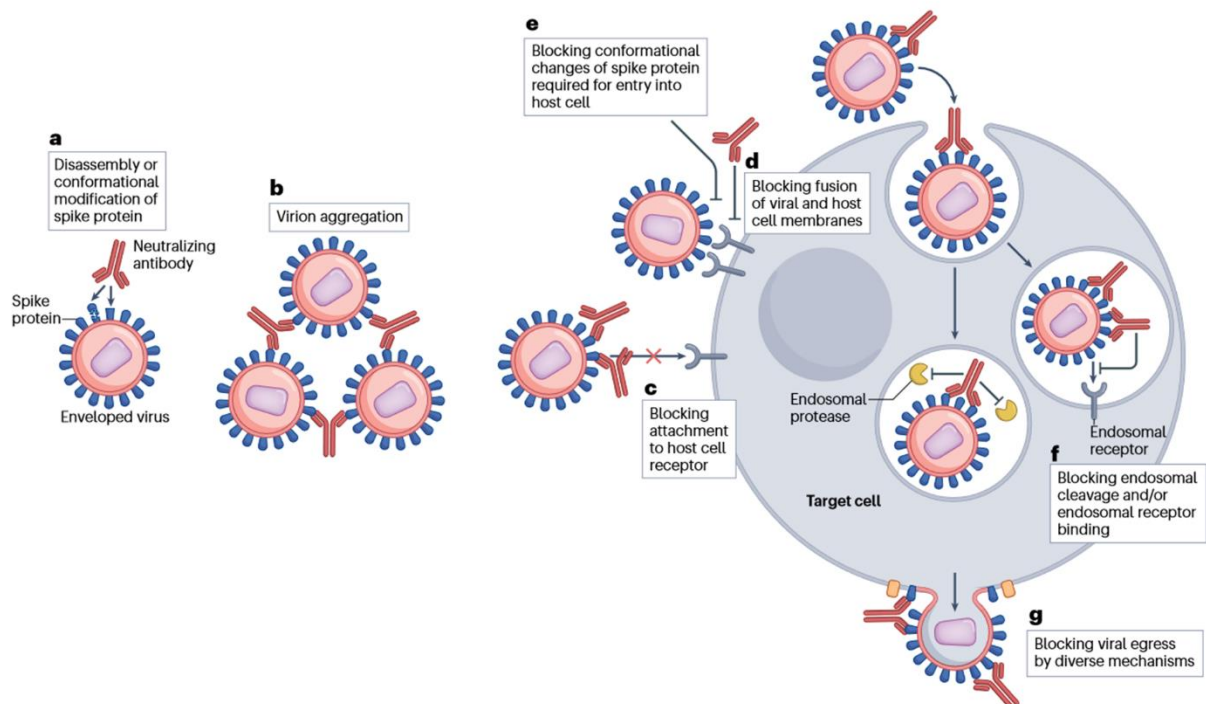
Comme présenté au-dessus, la fonction effectrice de neutralisation des anticorps correspond à la capacité de ce dernier à inhiber la réplication virale *in vitro*, en l'absence d'autres composants recrutés par le fragment Fc de l'anticorps (par exemple le complément ou des récepteurs du domaine Fc) (Burton et al., 2001, Klasse et al., 2014).

La neutralisation nécessite donc l'interaction entre le paratope du nAb (localisé au niveau de son domaine Fab) avec l'épitope correspondant porté par une molécule fonctionnelle présente à la surface de la particule virale, soit la glycoprotéine dans le cas des virus enveloppés (Greenspan, 2010). Dans ce cas, le nAb neutralise l'infectiosité des particules virales ou bien en bloquant leur liaison au récepteur cellulaire, ou bien en empêchant l'étape de fusion membranaire après internalisation de la particule virale (**Figure 35**).

Les nAbs peuvent entrer en compétition avec les interactions entre les particules virales et le récepteur cellulaire reconnu, soit par une compétition directe au niveau du site de fixation, soit en induisant une gêne stérique suite à leur attachement à G (**Figure 35**). Par exemple, la majorité des nAbs développés contre SARS-CoV 2 entravent l'interaction entre la spike S et le récepteur ACE2 (Walls et al., 2020), en ciblant notamment le domaine RBD de S1 de SARS-CoV 2 (Piccoli et al., 2020). Concernant RABV G, bien qu'aucune structure de G en complexe avec un récepteur cellulaire n'ait été résolue, il semble néanmoins que les résidus K330 et R333 soient nécessaire à la reconnaissance du récepteur potentiel p75NTR de RABV (Tuffereau et al., 1998). Il est donc envisagé que les mAbs ciblant le site antigénique III de RABV G neutralisent RABV en gênant sa liaison à son récepteur cellulaire. Ce serait notamment le cas du mAb 17C7, actuellement commercialisé en Inde (Rabishield, 2021), dont l'épitope est principalement localisé au niveau du site antigénique III de RABV G, et qui bloquerait donc la reconnaissance de p75NTR par RABV G (Ng et al., 2022), ou encore le mAb 523-11, qui cible un épitope similaire (Yang et al., 2020) (**Figure 35**).

Les nAbs peuvent également induire le changement de conformation de la glycoprotéine à la surface de la particule virale, ou son désassemblage si celle-ci est organisée en complexe (**Figure 35**) (Burton et al., 2023). Plusieurs cas de nAbs dirigés contre Env de HIV ont ainsi été décrits : leur liaison à Env déclenche un changement de conformation sur Env la rendant non fonctionnelle et empêchent de façon irréversible l'entrée virale (Murin et al., 2019).

Les nAbs peuvent également causer l'agrégation des particules virales, réduisant ainsi leur attachement aux cellules cibles (**Figure 35**) (Klasse, 2014, Burton, 2023). Le degré d'agrégation est déterminé par le ratio molaire particules virales / nAbs. Ce mécanisme a récemment été décrits dans des essais de neutralisation du virus Chikungunya par exemple (Zhou et al., 2020).



**Figure 35. Mécanismes de neutralisation des virus enveloppés par les anticorps neutralisants**

Extrait de Burton, 2023. Les mécanismes de neutralisation présentés dans le texte sont regroupés ici. **(A)** La liaison des nAbs à la particule virale peut provoquer le désassemblage ou le changement de conformation de G à la surface des particules virales. **(B)** Les nAbs peuvent provoquer l'agrégation des virions. **(C)** Les nAbs peuvent bloquer la liaison des virions au récepteur cellulaire par compétition directe ou gêne stérique. **(D)** Les nAbs peuvent bloquer l'étape de fusion membranaire. **(E)** Les nAbs peuvent bloquer le changement de conformation fusogène sur G. **(F)** Pour les virus internalisés par voie endosomale, les nAbs peuvent bloquer la liaison au récepteur endosomal ou sa dissociation. **(G)** Les nAbs peuvent bloquer la libération des particules virales néo-synthétisées.

Les nAbs peuvent également bloquer l'étape de fusion membranaire après internalisation de la particule virale. Le processus de fusion membranaire médié par G requiert un changement de conformation important de cette dernière et peut être gêné par la présence d'anticorps se liant directement ou à proximité de la machinerie de fusion de G (**Figure 35**) (Burton, 2023). Par exemple, il a été montré que le mAb RVC20 dirigé contre RABV, reconnaissant un épitope sur le site antigénique I

de G, bloque la région charnière entre le domaine PHD et le domaine FD de G (Hellert et al., 2020). Cette liaison empêche ainsi le repositionnement de ces deux domaines au cours de la transition structurale, bloquant donc le changement de conformation fusogène de G, et donc l'étape de fusion membranaire (Hellert et al., 2020). Ce processus de neutralisation est probablement partagé par les nAbs ciblant le site antigénique I de RABV G (Hellert et al., 2020, de Melo et al., 2022). Encore, il semblerait que le mAb murin 523-11, ciblant le site antigénique III de RABV G, emploie un mécanisme de neutralisation encore différent (Yang et al., 2020). En plus de potentiellement gêner la liaison au récepteur putatif p75NTR, il semblerait que la liaison de ce mAb à G à bas pH déstabilise le trimère de G par déplacement stérique d'un protomère voisin (Yang et al., de Melo et al., 2022). Cette inhibition de la trimérisation à bas pH de G est proposée pour être partagée par les anticorps ciblant le site antigénique III de RABV G (de Melo et al., 2022).

### **Les fonctions effectrices dépendantes du fragment Fc des anticorps**

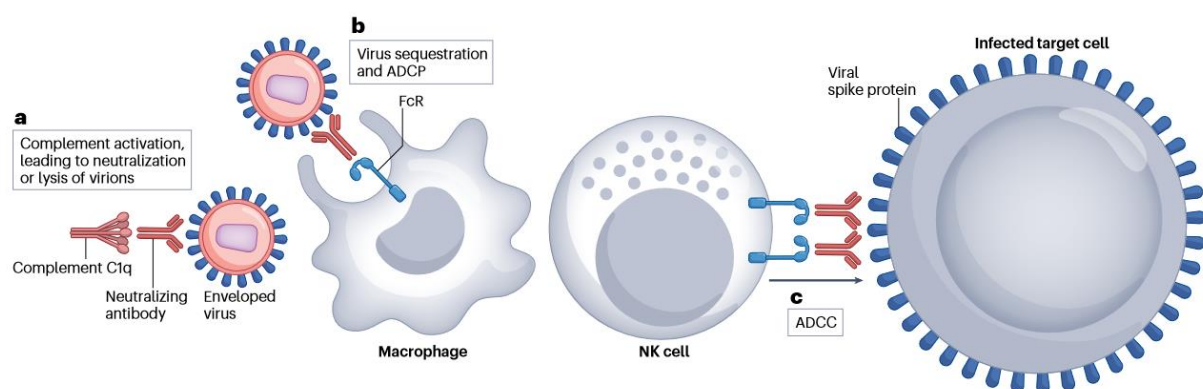
Ces fonctions effectrices reposent sur les propriétés du fragment Fc des anticorps qui recrute d'autres composants de la réponse immunitaire humorale (**Figure 36**) (Klasse, 2014). Ces effets sont surtout mesurés *in vivo*. Ces dernières années, ces mécanismes de neutralisation Fc-dépendants connaissent un regain d'intérêt (Lu et al., 2018), notamment du fait de leur importance dans la conception de vaccins (Bournazos et Ravetch, 2017). Quatre principales fonctions sont actuellement définies : l'opsonisation, le recrutement du système complément et deux fonctions de type ADC, pour *antibody-mediated cellular cytotoxicity or phagocytosis* (ADCC et ADCP respectivement).

L'opsonisation fait référence à la capacité des anticorps à promouvoir et/ou renforcer la capacité de capture d'antigènes par les phagocytes. L'opsonisation des particules virales par exemple, aboutit à la formation de complexes immuns qui peuvent être reconnus grâce aux fragments Fc des anticorps par des cellules présentatrices d'antigènes de l'immunité adaptatives.

L'ADCC fait référence à la reconnaissance des complexes immuns anticorps-antigènes par les récepteurs FcR des cellules *natural killer* NK qui reconnaissent le fragment Fc des anticorps (Klasse, 2014) (**Figure 36**). Un pendant de cette fonction est l'ADCVI, *antibody-mediated cellular virus inhibition*. L'ADCVI mesure *in vitro* l'effet global des anticorps sur la réplication virale en présence de cellules effectrices (Forthal et Moog, 2009, Klasse, 2014). Il est proposé que cette réponse joue un rôle dans l'inhibition de la réplication virale précoce du SIV par exemple (Xiao et al., 2012), tandis que dans les modèles murins, il semblerait que cette réponse participe à la protection contre le VIH, dans une certaine mesure (Hessel et al., 2007, Parsons et al., 2019). L'ADCP fait référence à la reconnaissance des complexes immuns anticorps-antigènes par les récepteurs FcR des cellules phagocytaires (monocytes, macrophages, neutrophiles et éosinophiles) (**Figure 36**) (Tay et al., 2019). De même que

pour l'ADCC, la part jouée par l'ADCP dans le processus de neutralisation *in vivo* des infections virales est difficile à évaluer et varie énormément d'un virus à l'autre (revu dans Tay et al., 2019).

Le système du complément regroupe un ensemble de protéines sériques qui interagissent en cascade catalytique aboutissant à l'élimination du pathogène (Mellors et Carroll, 2023). Il existe trois voies du complément : la voie classique, activée par la reconnaissance d'un complexe immun antigène-anticorps, la voie des lectines, activée par la reconnaissance de PAMPs, et la voie alterne, activée par l'hydrolyse spontanée de son composant C3, par la properdine ou par des protéases comme la thrombine et la kallikréine (Mellors et Carroll, 2023). Les trois voies du complément convergent toutes vers la formation d'un complexe d'attaque membranaire qui permet la lyse de la cellule infectée ou les particules virales enveloppées, qui y sont sensibles (Blue et al., 2004) (**Figure 36**). En plus de cette cytotoxicité, le système du complément possède également des propriétés d'opsonisation et de chimiotactisme (Mellors et Carroll, 2023). De nombreux exemples du rôle joué par cette réponse immunitaire sont revus dans Mellors et Carroll, 2023, pour une grande diversité de virus, notamment chez le CMV, le virus Ebola, le virus de la Rubéole, le SARS-CoV 2, les Hantavirus, HSV et le virus Influenza A. Par exemple, dans le cas de HSV et du virus Influenza, la présence du complément permet d'améliorer la neutralisation par les anticorps de ces virus (Frank et al., 1980, Blevins et al., 2019). Par contraste, l'ajout du complément dans des essais *in vitro* est associé à une augmentation de la facilitation de l'infection par des anticorps (ADE) et à une augmentation de la transmission de HIV par chimiotactisme (Robinson, 2006, Blue et al., 2004, Marasini et al., 2021).



**Figure 36. Fonctions effectrices médiées par le fragment Fc des anticorps**

Extrait de Burton, 2023. **(A)** L'activation du système du complément par la reconnaissance du complexe immun anticorps-virion (voie classique) induit la lyse des particules virales enveloppées. **(B)** La reconnaissance du fragment Fc des anticorps par les cellules immunitaires phagocytaires professionnelles induit la lyse des particules virales et des cellules infectées reconnues. **(C)** Les virions et les cellules infectées peuvent également être détruits suite à leur reconnaissance par des cellules NK, elles-mêmes reconnaissant le fragment Fc des anticorps attachés aux virions ou cellules (reconnaissance via le récepteur FcR des cellules NK).



Un schéma global se dégage actuellement concernant ces fonctions effectrices Fc-dépendantes : leurs contributions à la protection médiée par les nAbs *in vivo* dépend avant tout de la combinaison anticorps-virus, et ce même pour différents anticorps dirigés contre la même cible virale (Earnest et al., 2019, revu dans Burton et al., 2023). Les facteurs responsables des différentes dépendances aux fonctions Fc-dépendantes des anticorps restent peu compris actuellement (Burton et al., 2023).

Enfin, récemment, « l'effet vaccinal » des anticorps *in vivo*, initialement décrit en oncologie, connaît un regain d'attention dans le contexte d'infections virales (Burton et al., 2023). Dans ce contexte, les complexes immuns formés entre les protéines virales et les anticorps neutralisants sont présentés aux cellules dendritiques par leurs fragments Fc, induisant la présentation d'antigènes viraux et une immunité médiée par les lymphocytes T améliorée (Hilchey et al., 2009, DiLillo et al., 2015, Bournazos et al., 2020, Junker et al., 2020). Une étude récente sur le potentiel de neutralisation du mAb F11 contre RABV a montré que la *clearance* de l'infection dans le CNS des souris infectées repose à la fois sur la fonction de neutralisation de F11 mais également sur les fonctions Fc-dépendantes de F11 (Mastraccio et al., 2023). En particulier, il apparaît que F11 change significativement la population de leucocytes infiltrés dans le CNS des souris infectées, en particulier, une réponse immunitaire adaptative dépendante des lymphocytes T CD4 est nécessaire pour contrôler l'infection (Mastraccio et al., 2023).

#### **4- Stœchiométrie de la neutralisation virale par les anticorps**

##### **Théorie de l'occupation**

Indépendamment même du mécanisme de neutralisation mis en jeu par les anticorps neutralisants considérés, il est établi que plusieurs molécules d'anticorps sont nécessaires à la neutralisation de leur cible. Le modèle initial, dit *one-hit*, proposait que la fixation d'un seul anticorps sur l'épitope viral qu'il reconnaît soit suffisante pour neutraliser la particule virale (Klasse et al., 2014). Une autre version de cette théorie d'occupation propose que la neutralisation de la particule virale ait lieu lorsque le nombre d'anticorps liés au virion est suffisant pour former une couche dense à la surface des virions (Flamand et al., 1993, Burton et al., 2001). Cette théorie repose sur la comparaison de la taille plutôt importante d'une molécule d'immunoglobuline par comparaison avec la taille des protéines qui médient l'entrée des virions dans les cellules ciblées (Klasse et al., 2014, Flamand et al., 1993). Cette interprétation de la théorie de l'occupation propose ainsi que la neutralisation des virions soient avant tout due à la gêne stérique générée par cette couche d'anticorps autour du virion qui

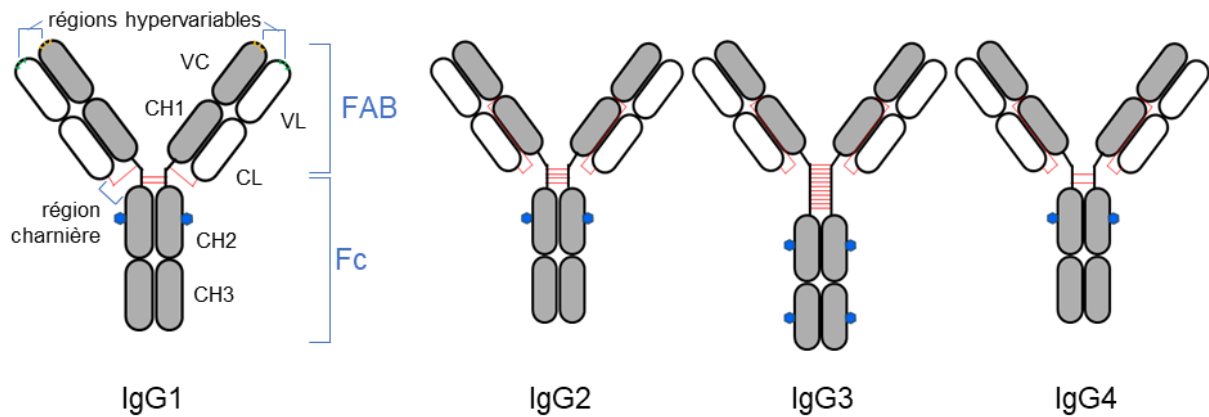
générait l'accès aussi bien à la protéine de surface impliquée dans l'entrée mais également aux autres protéines éventuellement présentes à la surface des particules virales (Klasse et al., 2014). Cette théorie implique également une relation linéaire entre l'aire de la surface du virion et le nombre minimal d'anticorps nécessaires à la neutralisation (Parren et Burton, 2001, Burton et al., 2001, Klasse et Burton, 2007).

Dans le cas de RABV, la conformation trimérique pré-fusion (8x8nm pour l'ectodomaine exposé à la surface du virion) est équivalente à la taille d'une molécule d'IgG (Flamand et al., 1993). Le nombre d'immunoglobulines nécessaire à la neutralisation de RABV a été estimé à partir d'une librairie d'IgG et IgM dirigés contre les sites antigéniques I, II et III de RABV G (Flamand et al., 1993). L'étude a montré que, bien qu'il existe des variations entre les anticorps testés, le nombre minimal d'IgG pour neutraliser RABV est de 130 molécules, et 40 dans le cas des IgM (Flamand et al., 1993). Ceci équivaut de 1 à 2 molécules d'IgG par trimères de G, et 1 molécule d'IgM pour 9 à 10 protomères de G (Flamand et al., 1993). En fonction de l'anticorps, la saturation est atteinte pour 1 à 3 IgG par trimère de G, et 1 molécule d'IgM pour 5 G, et ce indépendamment du site antigénique ciblé par les immunoglobulines (Flamand et al., 1993). L'observation des particules virales saturées par microscopie électronique a confirmé l'existence de cette couche recouvrant les virions (Flamand et al., 1993). Ensuite, une étude d'anticorps reconnaissant spécifiquement la conformation post-fusion de RABV G tend à confirmer cette théorie d'occupation (Raux et al., 1995). A pH neutre, quand l'essentiel des glycoprotéines sont dans leur conformation pré-fusion à la surface des virions, ces anticorps ne présentent pas d'activité neutralisante (Raux et al., 1995). En revanche, lorsque la majorité des G à la surface des virions transite vers leurs conformation post-fusion suite à l'abaissement du pH, les virions sont efficacement neutralisés par ces anticorps (Raux et al., 1995), ce qui va dans le sens de cette version de la théorie d'occupation (Klasse, 2014).

### **Affinité, avidité et flexibilité des anticorps**

En plus des éléments présentés précédemment, d'autres facteurs peuvent influencer l'activité de neutralisation des anticorps, notamment l'architecture de ces derniers (donc leur isotype et classe) (Burton et al., 2023). En effet, les différents isotypes et classes d'immunoglobulines possèdent différents degrés de flexibilité entre leur fragment Fc constitué par leur chaîne lourde et leurs deux fragments FAb (**Figure 37**) (Cser et al., 1976, Kamerzell et al., 2008, Stingaciu et al., 2016). Cette propriété influe directement sur le mode d'interaction des régions FAb avec la surface virale, tant au niveau de l'affinité intrinsèque de chaque fragment FAb avec l'épitope qu'il reconnaît qu'au niveau de l'avidité engendrée par la liaison bivalente des deux fragments FAb (Burton et al., 2023).

Par exemple, il est décrit que les IgG3 et IgG2a bnAbs dirigé contre Env de HIV présentent une activité de neutralisation plus importante que les IgG1, possiblement en relation avec leur flexibilité intrinsèque plus faible, notamment au niveau du domaine CH1 (Richardson et al., 2019, Scheepers et al., 2020, Tudor et al., 2012) (**Figure 37**).



**Figure 37. Organisation des IgG humaines**

L'organisation des 4 classes d'IgG humaines sont représentées ici. Les éléments constitutifs d'un IgG sont représentés sur l'IgG1, ils se retrouvent sur les autres classes. Les chaînes légères et lourdes sont représentées en blanc et gris respectivement. Les sucres portés par les chaînes lourdes sont représentés par un losange bleu. Les ponts disulfures présents au niveau de la région charnière et entre les deux chaînes, sont représentés en rouge. Leur nombre varie fortement en fonction de la classe de l'IgG.



# Objectifs de thèse

Le projet de thèse présenté ici s'organise autour de deux axes principaux :

## **1. L'étude structurale de la glycoprotéine de VSV G complète.**

Comme mentionné en introduction, aucune information structurale portant sur l'organisation de la région externe proximale de la membrane (MPER), du domaine transmembranaire (TM) et de la partie intravirale des G de Vésiculovirus et Lyssavirus n'est actuellement disponible. Or, comme mentionner en introduction, ces segments jouent un rôle clé dans le processus de fusion membranaire médié par G. La résolution de la structure complète de VSV G, dans ses différentes conformations, permettrait d'affiner notre compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours du processus de fusion membranaire. Récemment, la structure complète de gB de HSV-1, une autre glycoprotéine de classe III, a été résolue (Cooper et al., 2018). L'organisation de la MPER, du TM et du domaine intraviral de gB est complètement différente de celle décrite pour les glycoprotéines de classe I (Bento, et al., 2018). D'autre part, tous les domaines transmembranaires ne se valent pas. Lorsque l'ectodomaine de VSV G est fusionné au TM de HA, cela entraîne une inhibition totale de l'activité de fusion de G, ce qui n'est pas le cas quand le TM de VSV G est échangé avec celui de gB de HSV-1 (Odell et al., 1997, Ci et al., 2018). Cela soulève plusieurs questions, notamment celle de la potentielle conservation de l'organisation de ces segments au sein des glycoprotéines de classe III. L'obtention de structures complètes de glycoprotéines virales reste actuellement un défi malgré les avancées techniques de ces dernières années. Pour mener à bien cette étude, nous avons donc choisi une approche par cryo-EM qui sera détaillée par la suite.

De plus, à ce jour, il existe très peu de données sur la neutralisation de VSV, qui est pourtant un virus d'intérêt biotechnologique et thérapeutique majeur. Nous proposons ici une étude du complexe entre VSV G et le mAb neutralisant 8G5F11, capable de neutraliser plusieurs Vésiculovirus. Ce travail permet d'apporter des bases structurales sur la neutralisation des différentes souches de VSV et plus largement des Vésiculovirus.

## **2. L'étude structurale des G de Lyssavirus.**

Au début de ma thèse, très peu de données structurales étaient disponibles concernant la G des Lyssavirus. Actuellement, il n'existe des données structurales que sur les ectodomains de deux LYSV G, celles de RABV et MOKV (Yang et al., 2020, Ng et al., 2022, Callaway et al., 2022, Belot et al., 2020). Aucune structure trimérique post-fusion de LYSV G n'est résolue actuellement. Compléter le paysage conformationnel de G, notamment pour des LYSV plus divergents, permettrait d'affiner notre compréhension des bases moléculaires mises en jeu lors de l'entrée des Rhabdovirus dans la cellule hôte et permettrait d'apporter une base rationnelle pour la conception de molécules thérapeutiques.

# Résultats

## Résultats I. Étude de la structure complète de VSV G et caractérisation du complexe de G avec un anticorps neutralisant

Dans cette partie, le travail sur l'étude de la structure complète de VSV G ainsi que la caractérisation du complexe entre G et un anticorps neutralisant est présenté. En premier, l'article issu de ce travail, en cours d'élaboration, est présenté. Ensuite, des compléments sur les méthodes utilisées dans cette étude sont présentés. Enfin, une partie conclusion, discussion et perspectives clôture ce travail.

### **I. Article en cours de soumission**

Ce travail porte sur l'étude de VSV G entière, c'est-à-dire l'ectodomaine de G plus l'extrémité carboxyterminale de l'ectodomaine (CTD), le domaine transmembranaire (TMD) et le domaine intraviral (ICD) de G.

Cette étude, menée par cryo-EM sur VSV G complète purifiée à partir des particules virales, a permis d'observer le repositionnement du segment carboxyterminal le long du domaine de fusion à la fin du processus de fusion. D'autre part, cette étude a également mis en avant la flexibilité importante du domaine transmembranaire de G au sein de la micelle de détergent, ce qui suggère que ce domaine est également mobile au sein de la membrane virale.

Cette étude rapporte également la première structure de VSV G en complexe avec un anticorps neutralisant, reconnaissant à la fois les formes pré-fusion et post-fusion de plusieurs souches de Vésiculovirus. Les résidus clés dans cette interaction ont été identifiés par mutagenèse sur VSV G.

Ce travail augmente de façon significative nos connaissances sur la structure de G qui est la glycoprotéine la plus utilisée en biotechnologie pour délivrer un cargo et en thérapie génique pour le pseudotypage de vecteurs lentiviraux.

## **Cryo-EM analysis of VSV G alone and in complex with a neutralizing antibody**

Marie Minoves<sup>1</sup>, Malika Ouldali<sup>1</sup>, Laura Belot<sup>1</sup>, Stéphane Roche<sup>1</sup>, Eleftherios Zarkadas<sup>2</sup>, Guy Schoehn<sup>3</sup>, Yves Gaudin<sup>1</sup>, Aurélie Albertini<sup>1\*</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, UMR9198, 1 avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette, 91190, France

<sup>2</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, EMBL, ISBG, F-38000, Grenoble, France.

<sup>3</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, F-38000, Grenoble, France.

\* To whom correspondence should be addressed. Email: aurelie.albertini@i2bc.paris-saclay.fr

### **Abstract**

Vesicular stomatitis virus (VSV) is the prototype of the Vesiculovirus genus within Rhabdoviridae family. Its glycoprotein G – the main target of the host neutralizing antibody response mediates viral entry *via* clathrin-mediated endocytosis, then in the acidic endosomal environment VSV G undergoes a pH-dependent conformational change from pre- to post-fusion states that drive membrane fusion. While prior X-ray crystallography studies provided structures of VSV G ectodomain, no full-length structure has been reported. Here, we describe cryo-EM structures of VSV G, isolated from viral particles with detergent, alone and in complex with an antigen-binding fragment (FAb) of a neutralizing antibody. The post-fusion structure reveals novel details about the organization of the C-terminal part of the ectodomain (CTD), missing in previous models. This finding confirms that CTD undergoes significant conformational rearrangements during membrane fusion and contributes to the stability of the post-fusion trimer by embedding itself into a hydrophilic groove between adjacent fusion domains. Structures of VSV G FAb complex show that the neutralizing epitope corresponds to a major antigenic site conserved among Vesiculoviruses. This work advances our understanding of VSV G fusion mechanism and neutralization, with potential implications for vaccine development and oncolytic virotherapy.



## Introduction:

Vesicular stomatitis virus (VSV) is the prototype of the Vesiculovirus genus in the Rhabdoviridae family. It is an enveloped, bullet-shaped virus capable of infecting a wide range of hosts, including mammals and insects, and is responsible for epizootic outbreaks in cattle in North America (Pelzel-McCluskey, 2024). Its negative-strand RNA genome encodes five structural proteins among which the glycoprotein (VSV G) is the sole transmembrane protein. VSV G plays a crucial role in initiating the viral cycle. It is responsible for both receptor recognition and membrane fusion. Interaction of VSV G with a cellular receptor, particularly members of the LDL-R family (Finkelshtein et al., 2013; Nikolic et al., 2018), triggers clathrin-mediated endocytosis of VSV (Cureton et al., 2009; Johannsdottir et al., 2009). Then, within the acidic environment of the endosome, VSV G catalyzes fusion between viral and endosomal membranes. Indeed, VSV G undergoes a low pH-induced fusogenic conformational change from a pre- toward a post-fusion state. This structural transition results in the transient exposure of hydrophobic motifs (called fusion loops) capable of interacting with the target membrane and destabilizing it, ultimately leading to its fusion with the viral envelope. A particularity of VSV G, shared with other rhabdovirus glycoproteins, is that there is a pH-dependent equilibrium between the pre-fusion state (Albertini et al., 2012; Roche and Gaudin, 2002; Zagouras and Rose, 1993), the post-fusion state, and intermediate conformations on the conformational change pathway. Consequently, the structural transition induced by low pH is reversible (Doms et al., 1987; Gaudin et al., 1993; Kim et al., 2017), which is not the case for other viral fusogens whose pre-fusion conformation is metastable (Gaudin, 2002, 2000).

VSV G is a type I transmembrane protein. After cleavage of the amino terminal signal peptide, the mature glycoprotein is 495 amino acids (aa) long, the major part being its ectodomain ( $G_{ect}$ , 446 aa). To date, the 3D structures of VSV G soluble ectodomains have been determined using X-ray crystallography (Beilstein et al., 2020; Roche et al., 2007, 2006). These soluble ectodomains were either obtained by proteolytic cleavage at the viral surface or expressed recombinantly, with the membrane anchor being removed in all cases (Albertini et al., 2012). Crystal structures of VSV  $G_{ect}$  are available in both pre-fusion (Beilstein et al., 2020; Roche et al., 2007) and post-fusion trimeric conformations (Roche et al., 2006). These structures revealed that VSV G shares a common fold with other viral fusion glycoproteins (including gB of herpesviruses (Heldwein et al., 2006) and gp64 of baculoviruses (Kadlec et al., 2008)), which defines class III membrane fusion proteins (Backovic and Jardetzky, 2009; Baquero et al., 2015a). Subsequently, crystal structures of Chandipura virus glycoprotein (CHAV G, another glycoprotein of the Vesiculovirus genus) soluble ectodomain were also solved, corresponding to the post-fusion trimeric conformation (Baquero et al., 2015b) and two monomeric intermediates (Baquero et al., 2017). More recently, the structure of VSV  $G_{ect}$  in complex with its cellular receptor binding

domains (i.e., the CR2 and CR3 cysteine-rich domains of the low-density lipoprotein receptor (LDL-R)) was resolved, revealing the organization of the receptor-binding site on VSV G (Nikolic et al., 2018).

$G_{\text{ect}}$  includes three distinct structural domains (nomenclature defined in **Fig. 1a**): the fusion domain (FD), the trimerization domain (TrD), and the pleckstrin homology domain (PHD) that keep their structure during the conformational change. These domains are connected by hinge regions (named R1, R2, R3, R4 and R5) that, in contrast, refold during the structural transition, and therefore reposition structural domains (Belot et al., 2019; Roche et al., 2008). Finally, the C-terminal domain (CTD) connects the ectodomain to the transmembrane domain (TMD) (**Fig. 1a**).

To date, no complete structure (*i.e.* including the TMD and the intra-viral or intra-cytoplasmic domain -ICD-) of VSV G has been reported. It should also be noted that only part of the structure of the CTD is known (up to residue 432 for the pre-fusion state and residue 410 for the post-fusion state). Interestingly, several mutagenesis studies suggest that the CTD, along with the TMD, are critical for G to mediate membrane fusion, especially in the final steps of the process (Ci et al., 2018; Cleverley and Lenard, 1998; Dennison et al., 2002). Thus, the mechanistic steps of G refolding and membrane fusion process are not fully understood due to the lack of structural information on the CTD and TMD.

VSV G ectodomain is the primary target of neutralizing antibodies. Although the antigenicity of VSV G has been characterized (Lefrancois and Lyles, 1983; Munis et al., 2018), no structural data of any VSV G / monoclonal antibody (mAb) complex have been reported so far.

Here, we report a cryo-electron microscopy study of detergent-solubilized full-length VSV G purified from viral particle. This study allows us to complete the structures of the ectodomain in its pre- and post-fusion conformations in a more physiological context. In particular, we extend our knowledge of the structure of the CTD in the post-fusion conformation and provide data that indicate that the TMDs do not associate in the detergent micelle, suggesting that they are rather mobile within the membrane. We also describe the first structures of VSV G bound to a commercial neutralizing antibody (mAb 8G5F11). This mAb binds G in both its pre- and post-fusion conformations. These first structures of a complex between G and a neutralizing antibody allowed the characterization of the epitope in detail and the identification of key residues on VSV G involved in this interaction. Globally, this work increases our knowledge of the structure of VSV G, the most widely used glycoprotein in biotechnology for the delivery of cargo and in gene therapy for lentivirus pseudotyping, and its low-pH induced refolding pathway.

## Results

### Overall structures of detergent solubilized VSV G in the pre- and post-fusion states

To gain insight into the full-length structure of VSV G *i.e.* the ectodomain plus the TMD and ICD (**Fig. 1a**), we developed a protocol to isolate VSV G (Indiana strain) from concentrated virus particle preparations without any affinity purification tag. Briefly, VSV G was extracted directly from viral membranes using lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and subsequently purified to homogeneity through successive chromatography steps (**Fig. 1a, and Supplementary Fig. 1**). We then performed cryo-electron microscopy (cryo-EM) single-particle analysis (SPA) on VSV G incubated at pH 8.0 (VSV G pH 8.0) and at pH 5.5 (VSV G pH 5.5) (**Supplementary Fig. 2-3**).

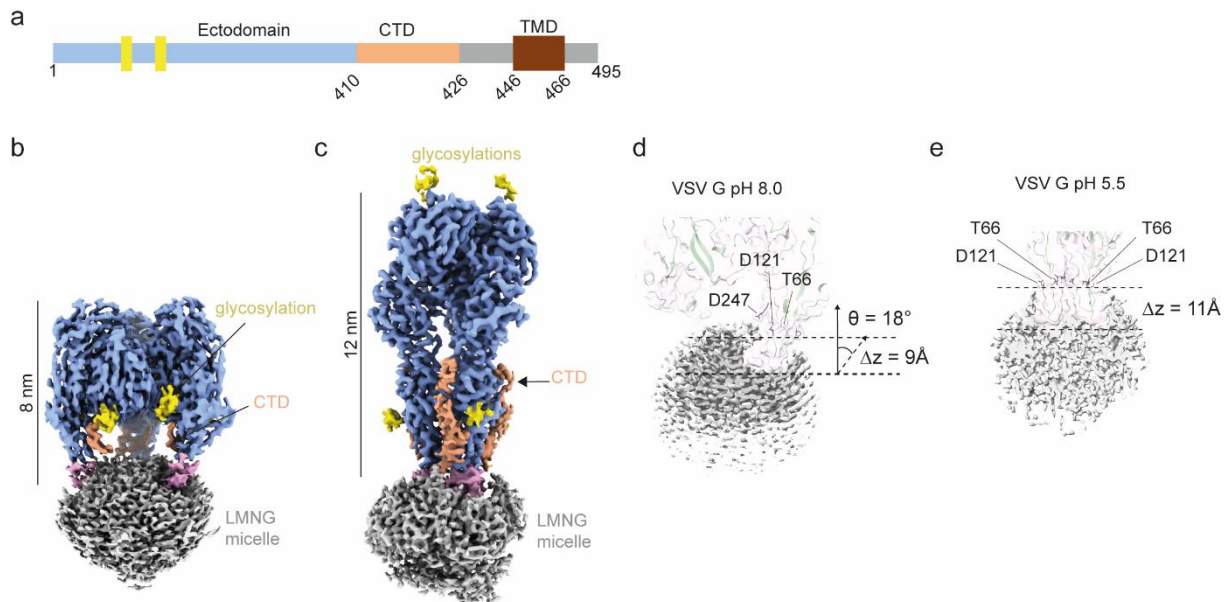
2D class averages were generated for both VSV G pH 8.0 and VSV G pH 5.5. Analysis of the 2D classes revealed a preferential orientation of the molecule in both conditions, with approximately 80 % of the particle exhibiting top views (**Supplementary Fig. 2-3**). Using automated particle picking to enrich the data set with sides views, data processing yielded eventually reconstructions with an overall resolution of 2.9 Å for both the high- and low-pH structures (**Fig. 1b-c**).

The overall structure of the ectodomain in both reconstructions was consistent with previous studies, showing a trimeric spike with dimensions in height of 8 nm at pH 8.0 and 12 nm at pH 5.5, corresponding to the pre- and post-fusion conformations (Albertini et al., 2012; Libersou et al., 2010), respectively (**Fig. 1b-c**) and associated with a detergent micelle at the FD tips. Notably, the presence in the sample of TMD and ICD (**Fig. 1a and Supplementary Fig. 1**) did not appear to influence the global structure of VSV G ectodomain (**Fig. 1b-c**). Indeed, structural overlay of the crystallographic- and cryo-EM- derived models yielded root-mean-square deviations (RMSD) for the C $\alpha$  backbone of 0.78 Å for the pre-fusion structure and 0.69 Å for the post-fusion structure (PDB code 6TIT(Beilstein et al., 2020) and 5I2M (Roche et al., 2006) respectively) (**Table S1**). Additionally, there was a very clear density for the starting residues of the two glycosylation chains (N163 and N325) (Machamer and Rose, 1988) in both structures (**Fig. 1b-c**). It is worth noting that when compared with the crystallographic structure of the post-fusion state of VSV G (Roche et al., 2006) an additional density corresponding to part of the CTD was visible in the ectodomain of the post-fusion cryo-EM structure (**Fig. 1c**, in orange).

Despite repeated attempts to visualize the content of the detergent micelle using several computational cryo-EM methods (such as 3D-classification, 3DVA, 3DFLEX and several masking strategies), the TMDs (resp. the ICDs) were not discernible within (resp. in the vicinity of) the micelle (**Fig. 1b-c**) in both conformations, although SDS-PAGE did not reveal any proteolysis (**Supplementary Fig. 1**).

On the other hand, the tips of FDs were visible inside the micelles, suggesting that the absence of detection of TMDs in the density is due to the fact that TMDs are mobile and do not have a fixed

position within the micelle. Measurements indicate that the penetration depth of FDs into the micelle is approximately 10Å for both conformations (**Fig. 1d-e**). This is consistent with the organization of the micelle of LMNG having a hydrophobic core radius of 14 Å and a hydrophilic shell thickness of 7 Å (Breyton et al., 2019). This allows the accommodation of the hydrophobic residues in the fusion loop in the hydrophobic core as well as several polar or charged residues in the hydrophilic shell.



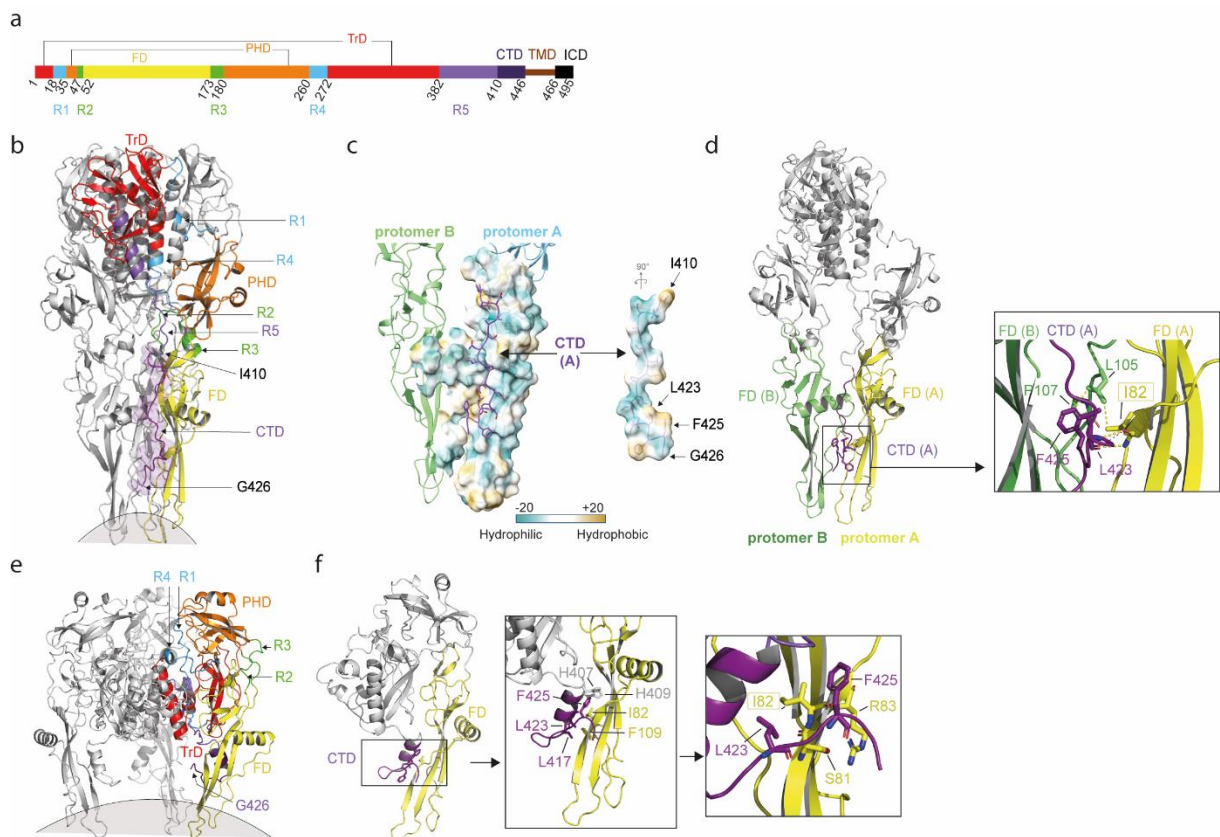
**Fig. 1 VSV G cryo-EM structures in its pre- and post-conformations**

**a** Schematic diagram of VSV G sequence. The ectodomain of G is in blue, the CTD (res 410-426) in orange, the TMD in brown and the unsolved part in grey. **b-c** Cryo-EM density map of VSV G incubated at pH 8.0 (**b**) and at pH 5.5 (**c**). G ectodomain is in sky-blue, the LMNG micelle is in grey, and starting residues of the glycosylation chains are in yellow. The part of the fusion domain inserted in the micelle is colored in pink, and the CTD in orange. **d-e** Close-up view of the fusion loops insertion into the micelle at pH 8.0 (**d**) and pH 5.5 (**e**). Residues that prevent the deep penetration of FD into the micelle are indicated.

### Reorganization of the C-terminal linker region

The resolution of the CTD in the post-fusion conformation is approximately 4.5 Å, allowing for its partial tracing up to residue 426 (**Fig. 2b**). For each protomer, the traced segment extends in a predominantly hydrophilic groove (**Fig. 2c**) located between this protomer (protomer A) and the neighboring one (protomer B). Structural analysis reveals a hydrophobic patch on the CTD, composed of residues L423 and F425, which interact closely with residue I82 located on the FD of the same protomer (protomer A) and residue L105 and P107 of the FD of the neighboring protomer (protomer B) (**Fig. 2d**). This hydrophobic interaction stabilizes the C-terminal domain against the FD. Sequence alignment of Vesiculovirus glycoproteins indicates that these residues are conserved, maintaining their hydrophobic character among the genus (**Supplementary Fig. 4**).

In the pre-fusion conformation, the overall structure of the ectodomain was similar to previously determined crystal structures (Beilstein et al., 2020), with the CTD defined up to residue 426 (**Fig. 2e-f**). In both X-ray crystallography and cryo-EM pre-fusion structures, the CTD forms a small helix (res 409 to 416) followed by a  $\beta$ -turn between P418 and E421 and a short  $\beta$ -hairpin (res 422 to 432, only visible up to res 426 in the cryo-EM structure) forming a hook-like structure (**Fig. 2f**), indicating that the presence (or absence) of the TMD of VSV G does not interfere with its fold. Notably, in the pre-fusion conformation, the hydrophobic residues L423 and F425 on the CTD also form a hydrophobic cluster with I82 on the FD (**Fig. 2f**). Thus, this hydrophobic cluster is present in both the pre- and post-fusion states and, in both cases, it locks the CTD in close proximity to the FD (**Fig. 2d and Fig. 2e-f**). However, the organization of the CTD is completely different between the two structures (**Fig. 2d and Fig. 2e-f**). Thus, the CTD, as R1, R2, R3, R4 and R5 segments, refolds during the low-pH induced structural transition of VSV G.



**Fig. 2 VSV G CTD rearrangement**

**a** Schematic diagram of VSV G sequence. The trimerization domain (TrD) is shown in red, the pleckstrin homology domain (PHD) in orange, and the fusion domain (FD) in yellow. Domains are connected by segments (named R1 to R5) that refold during conformational change: segments R1 and R4 are in cyan, segments R2 and R3 are in green, R5 and the CTD are in light and deep purple, respectively. Transmembrane domain (TMD) and intra-cytoplasmic domain (ICD), which were not resolved in our structures, are also indicated. **b** Ribbon diagram of VSV G trimer in its post-fusion conformation, fitted and traced up to residue 426 in the cryo-EM map obtained at pH 5.5. **c** Hydrophobic surface interaction

between segment 410-426 of chain A (right) and neighboring FD (left) in the post-fusion conformation. The hydrophobicity scale is indicated. **d** Hydrophobic patch at the level of the CTD (L423 and F425) interacting with I82 and L105 stabilizes the CTD close to the FD in the post-fusion conformation. **e** Ribbon diagram of VSV G trimer in its pre-fusion conformation, fitted and constructed in the cryo-EM map obtained at pH 8.0. **f** Close-up views on VSV G CTD in the pre-fusion conformation. The middle panel shows the folding of the CTD. The left panel provided a detailed view of the environment surrounding L423 and F425 in VSV G pre-fusion conformation (left panel).

### Neutralization of VSV by mAb 8G5F11

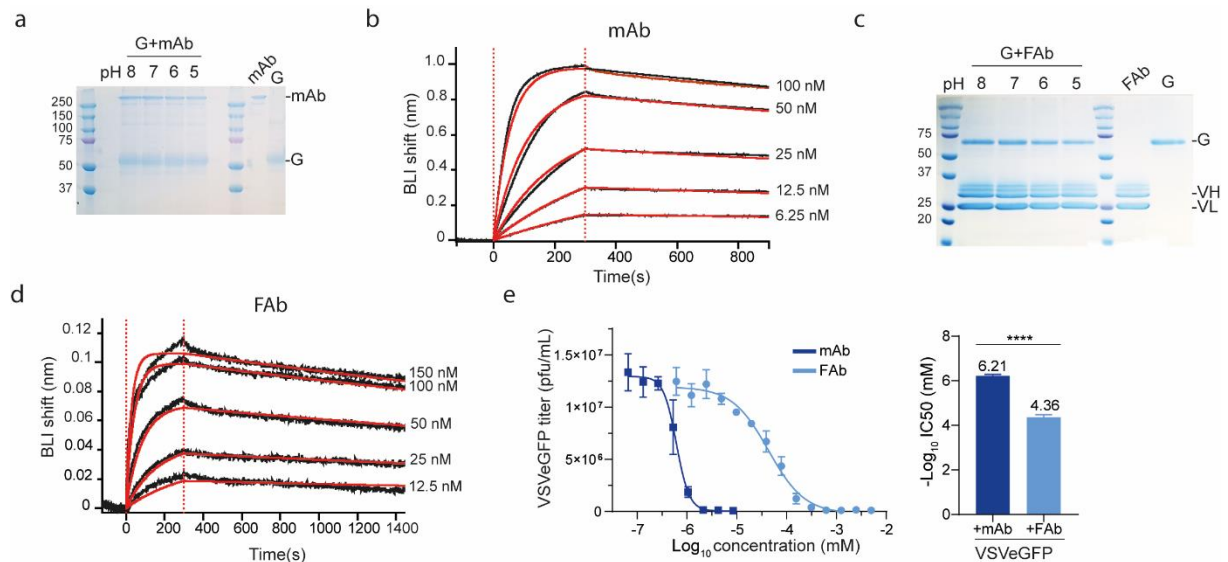
The commercial monoclonal antibody 8G5F11 (Lefrancois and Lyles, 1983) neutralizes VSV and other Vesiculoviruses (Munis et al., 2018). To characterize the interaction of VSVG with mAb 8G5F11, we incubated purified mAb at various pH values with magnetic beads coated with protein A, followed by the addition of purified full-length VSV G pre-incubated at the corresponding pH values. After an incubation of 30 min, beads were washed, and the associated proteins were analyzed by SDS-PAGE. These interaction experiments demonstrated that 8G5F11 is able to bind VSV G over a range of pH values from 8.0 to 5.0 (**Fig. 3a**). This suggested that 8G5F11 recognizes several VSVG conformations.

Additionally, we employed bio-layer interferometry (BLI) to investigate the binding parameters of coated mAb 8G5F11 to VSV G<sub>ect</sub> at pH 8. For this, we used the thermolysin-generated VSV G<sub>ect</sub> (aa residues 1–422) that is monomeric in solution (Albertini et al., 2012). Analysis of the BLI data revealed that mAb 8G5F11 exhibited a binding affinity in the nanomolar range against VSV G<sub>ect</sub> at pH 8.0 (**Fig. 3b**).

We engineered the corresponding FAb fragment of mAb 8G5F11. For that, variable heavy (VH) and light (VL) chains of mAb 8G5F11 were sequenced and cloned into an insect cell expression vector (**Supplementary Fig. 5**). The construction resulted in a FAb C-terminally fused to a STREP-TagII. After establishment of the stable S2 cell line, recombinant FAb was purified from cell culture media by affinity chromatography followed by SEC (**Supplementary Fig. 5**). Interaction experiments conducted under the same conditions as for the mAb 8G5F11 show that FAb 8G5F11 binds VSV G across the same pH range, with BLI measurements also indicating a binding affinity in the nanomolar range (**Fig. 3c-d**).

To determine the IC<sub>50</sub> values of mAb 8G5F11 and its corresponding FAb, we performed neutralization experiments by pre-incubating a recombinant VSV that express eGFP (VSV-eGFP) with serial dilutions of mAb or FAb. After 30min of incubation, the inoculum was transferred onto HEK-293T cells. Following 5h of infection, the percentage of infected cells (expressing eGFP) was measured by flow cytometry. Both mAb 8G5F11 and FAb 8G5F11 inhibit VSV infection in a dose-dependent manner. Calculated viral titers were plotted against the concentration of mAb or FAb and a dose-response curve was obtained using the hill equation (**Fig. 3e**). The estimated IC<sub>50</sub> value for the FAb 8G5F11 was approximately 40 nM, whereas it decreased to 0.6 nM when neutralization was performed with the

mAb 8G5F11. Fab 8G5F11 neutralization curve exhibits a Hill coefficient of  $1.2 \pm 0.17$  whereas mAb neutralization curve has a Hill coefficient of  $3.35 \pm 0.79$  indicating some cooperativity effect (**Fig. 3e**). This was consistent with the divalent nature of the mAb, which induces avidity-enhanced binding to VSV G, and also with its larger size, which increases steric hindrance and thus decreases the number of mAbs compared to that of FAbs required to neutralize a virion.



**Fig. 3 mAb 8G5F11 interacts with the pre- and the post-fusion conformations of VSV G**

**a** Coomassie-stained SDS-PAGE analysis (non-reducing conditions) of interaction experiments between VSV G and mAb 8G5F11 bond to protein A magnetic bead, incubated at various pHs. **b** BLI sensograms showing the binding kinetics of VSV G<sub>ect</sub> to mAb 8G5F11 at pH 8.0. Experimental curves (black) were fitted (red) using a 1:1 binding model. One representative experiment over 3 is shown. **c** Coomassie-stained SDS-PAGE analysis (reducing conditions) of interaction experiment between VSV G and FAb 8G5F11 bond to MagStrep type 3 XT beads, incubated at various pHs. **d** BLI sensograms depicting the binding kinetics of VSV G<sub>ect</sub> to 8G5F11 FAb at pH 8.0. Experimental curves were fitted using a 1:1 binding model. One representative experiment over 3 is shown. **e** Neutralization of VSV-eGFP by mAb (dark blue) and FAb (light blue) by 8G5F11 mAb (left panel) and FAb (right panel). VSV-eGFP was preincubated with increasing concentrations of mAb or Fab. At 5 hours *p.i.*, the percentage of infected cells determined by counting the number of cells expressing eGFP using flow cytometry. This was used to calculate the infectious viral titer. Data depict the mean with standard error from experiments performed in triplicate. Average IC<sub>50</sub> value were calculated and analyzed via unpaired t-test (right panel). The inverse Log<sub>10</sub> of IC<sub>50</sub> values are represented as mean  $\pm$  SD (right panel), indicating that the lower the value, the higher the neutralizing concentration. Three independent experiments were performed. \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ .

### Structural characterization of FAb 8G5F11 bond to VSV G

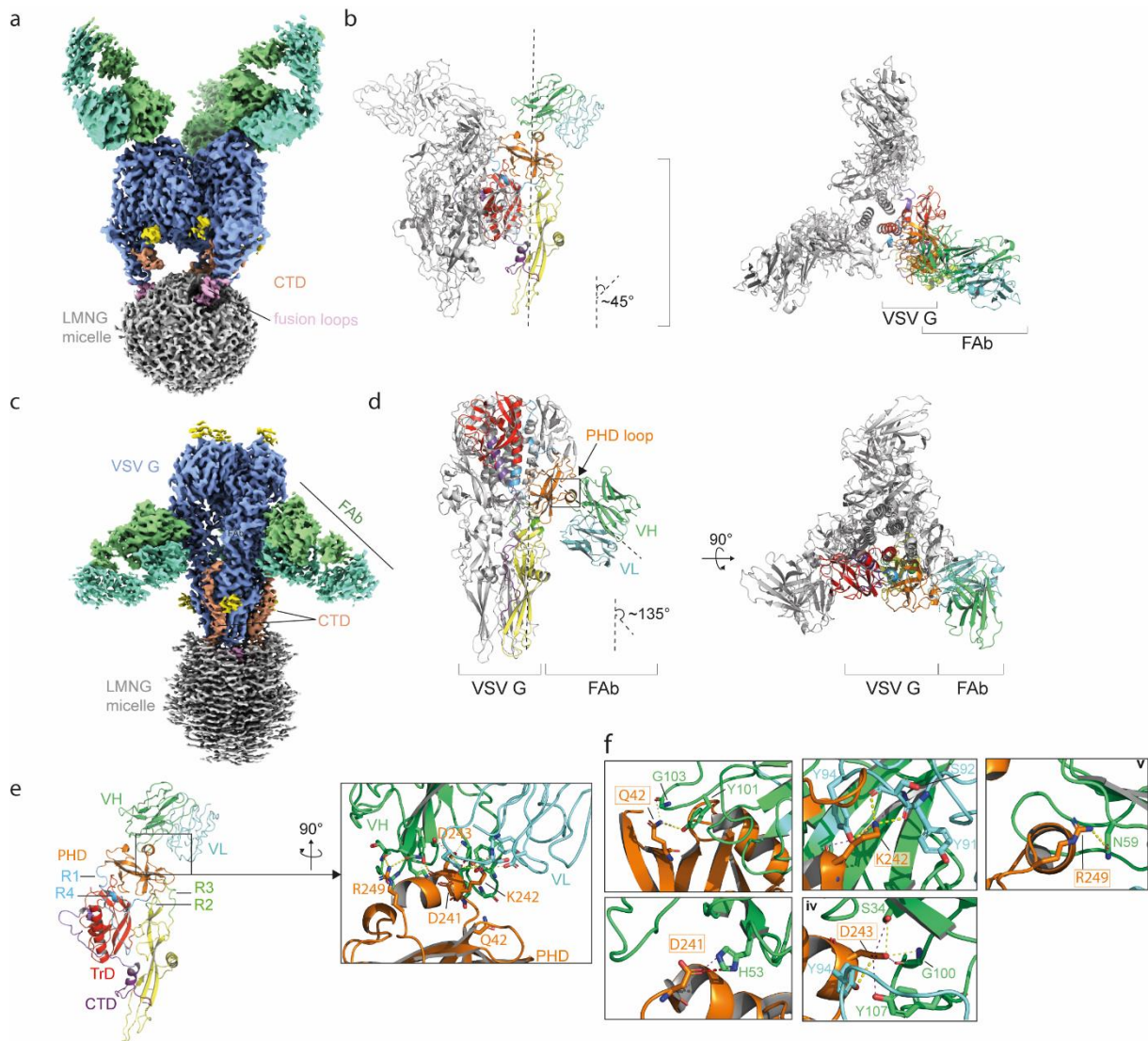
To better understand how mAb 8G5F11 binds VSV G at different pH values, we performed cryo-EM SPA on VSV G in complex with FAb 8G5F11 at pH 8.0 and pH 5.5 (**Supplementary Fig. 6-7**). The cryo-EM structure of VSV G in complex with the FAb revealed a stoichiometric binding of one FAb

per protomer at both pHs (**Fig. 4a** and **Fig. 4c**). At pH 8.0, the FAb binds each VSV G protomer at the top of the molecule (**Fig. 4a-b**) with an angle of approximately 45° with respect to the axis 3 of the trimer (**Fig. 4b**). At pH 5.5 the binding site is the same but the relative orientation of the FAb is different with an angle of 135° (**Fig. 4d**).

The binding of the FAb did not influence the structure of the ectodomain; at pH 8.0 VSV G is in its pre-fusion conformation and at pH 5.5 VSV G is in its post-fusion conformation (**Table S1**). The complexes between G and the FAb did not allow us to determine the structure of new parts of G. We have still not been able to observe the C-terminal part of the CTD, nor the TMD, nor the ICD.

In both structures, the interface between the FAb and VSV G is the same and principally involves the variable heavy chain (VH) of the FAb binding to the VSV G PHD (**Fig. 4b, 4d and 4e**). Three VSV G residues (D241, K242, and D243) are located at the core of the interface between G and 8G5F11 paratope. D241 establishes polar contact *via* its side chain with residue H53. The side chain of D243 establishes a cluster of polar contact with 8G5F11 involving the hydroxyl groups of residues Y94 (on the VL chain), S34 (on the VH chain), and Y107 (on the VH chain) as well as with the C=O of the main chain of G100 (on the VH chain). K242 side chain interacts with Y94 hydroxyl group and main chain of Y91 and S92 of the LC chain. Two other residues (Q42 and R249) located outside of the core also contribute to the interaction. The amide group of side chain of residue Q42 in VSV G establishes hydrogen bonds with the C=O of the main chain of G103 and the -OH group of Y101 on the VH chain of the FAb. Finally, guanidine group of R249 on VSV G establishes H-bonding with N59 side chain of the VH chain. The charged character of the residues located in the core of the interface, corresponding to D241, K242 and D243, are conserved among Vesiculovirus genus (**Supplementary Fig. 4**). This explains why 8G5F11 is a broadly neutralizing antibody (Munis et al., 2018).



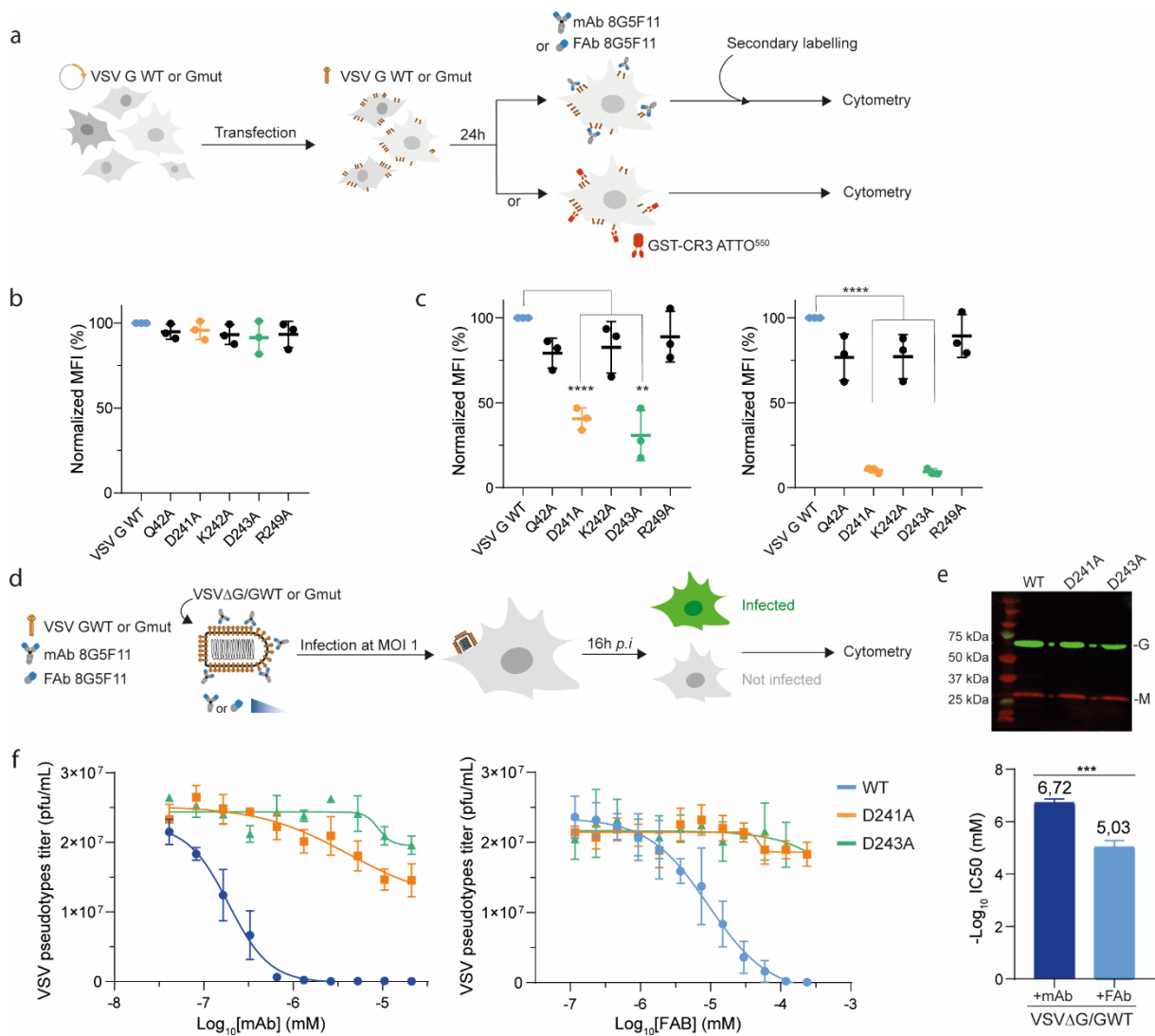


**Fig. 4 Structural basis for the neutralization of VSV by mAb 8G5F11**

**a** Cryo-EM density map of VSV G in complex with FAb 8G5F11 at pH 8.0 shown in side view orientation. One 8G5F11 FAb molecule was observed to bind to each protomer of VSV G. G ectodomain is in sky-blue, the LMNG micelle in grey, the starting residues of the glycosylation chains are in yellow. Fusion loops are in pink and CTD in orange. FAb chains are in green and cyan. **b** Ribbon diagram of VSV G trimer in the pre-fusion conformation in complex with FAb 8G5F11, viewed from the side (left panel) and from the top (right panel). The VSV G model was fitted in the density and traced up to residue 426. The variable heavy (VH) and light (VL) chains of the 8G5F11 Fab were modeled and fitted in the identified density. The same color code for G as in **Fig. 2a** is used. **c** Cryo-EM density map of VSV G in complex with FAb 8G5F11 at pH 5.5, shown in side orientation. The same color code as in **Fig. 1b** is used. **d** Ribbon diagram of VSV G post-fusion trimer in complex with FAb 8G5F11, viewed from the side (left panel) and from the top (right panel). As in the pre-fusion state, one molecule of FAb binds each VSV G protomer of the post fusion trimer. The VSV G model was fitted in the density and traced up to residue 426, while the variable heavy (VH) and light (VL) chains of the 8G5F11 Fab were fitted in the identified density. The same code for G as in **Fig. 2a** is used. FAb VH chain is in green and VL chain is in cyan. **e-f** Interaction between 8G5F11 and VSV G. Key residues are depicted in stick representation and are highlighted in the boxed panels in **(f)**. **f** Close up on the residues involved in the antibody-antigen interaction at high pH. VSV G PHD is in orange, and the key residues interacting with 8G5F11 are depicted in sticks.

### Characterization of 8G5F11 binding site

To investigate the contribution of residues constituting the mAb 8G5F11 binding site on VSV G (**Fig. 4e**), we generated alanine mutants at positions Q42, D241, K242, D243, R249 of G. HEK-293T cells were transfected with plasmids encoding either wild type (WT) VSV G or VSV G alanine mutants (Gmut: Q42A, D241A, K242A, D243A or R249A). Surface expression of the VSV G mutants was confirmed using a conformational probe, GST-CR3 (glutathione S-transferase fusion with the CR3 domain of the LDL-R (Nikolic et al., 2018)), labeled with a fluorescent dye ATTO<sup>550</sup> (**Fig. 5a**). Indeed, GST-CR3 binds VSV G in its pre-fusion conformation and its binding site is distinct from the binding site of mAb 8G5F11 (Beilstein et al., 2020; Nikolic et al., 2018) (**Supplementary Fig. 8**). Flow cytometry analysis confirmed that all mutants were correctly expressed at the cell surface, as evidenced by their efficient binding to the CR3-GST conformational probe (**Fig. 5b**). Then, we assessed the ability of VSV G mutants to bind mAb 8G5F11 and its corresponding FAb on the cell surface. Mutations D241A and D243A induced a significant reduction in binding for both the mAb and FAb 8G5F11 (**Fig. 5c**). Afterwards, we evaluated whether these mutant glycoproteins (VSV G D241A and VSV G D243A) could maintain viral infection. We employed a recombinant VSV (VSVΔG) lacking the G envelope gene, replaced by the green fluorescent protein (GFP) gene pseudotyped with VSV glycoprotein (**Fig. 5d**). The incorporation of VSV G mutants into the membrane of VSV pseudotypes was verified by Western-blot analysis (**Fig. 5e**). Indeed, the VSVΔG/GD241A and VSVΔG/GD243A pseudotypes exhibit an equivalent level of glycoprotein incorporation to that observed with VSVΔG/GWT. Infectivity of VSV pseudotypes in HEK-293T cells was determined by flow cytometry, measuring the percentage of infected cells 16 hours *p.i.* In the absence of antibody, both VSVΔG/GWT and VSVΔG/Gmut pseudotypes exhibited comparable infectious titers, approximately  $2 \times 10^7$  pfu/ml (**Fig. 5f**, left panel). We then performed neutralization experiments by pre-incubating VSVΔG/GWT and VSVΔG/Gmut inoculum with serial dilutions of mAb or FAb 8G5F11 (**Fig. 5f**). As expected, VSVΔG/GWT pseudotype was efficiently neutralized by mAb and FAb 8G5F11, with IC<sub>50</sub> values of 0.2 nM and 10 nM respectively (**Fig. 5f**, right panel). In contrast, VSVΔG/GD241A and VSVΔG/GD243A pseudotypes were not neutralized by FAb or mAb 8G5F11 at either concentration, indicating that these residues play a crucial contribution to mAb 8G5F11 binding and neutralization activity (**Fig. 5f**, left panel).



**Fig. 5 Residues D241 and D243 are essential for the interaction of 8G5F11 with VSV G and for neutralization.**

**a** Schematic description of the binding assays used to assess the capacity of VSV G WT and VSV G alanine mutants to bind CR domains and 8G5F11 mAb or FAb. **b** Surface expression test for VSV G WT and VSV G alanine mutants by measuring their ability to bind the conformational probe (CR3-GST labelled by and ATTO<sup>550</sup> fluorophore). The histogram indicates the mean fluorescence intensity of ATTO<sup>550</sup> positive cells for each G construct. Three independent experiments were performed. Error bars represent the standard deviation. **c** Antibody recognition assay for VSV G WT and mutants G by measuring their ability to bind 8G5F11 mAb (left panel) or FAb (right panel). **d** Schematic description of the neutralization assay using VSVΔG/G pseudotypes. **e** Incorporation of VSV G WT and VSV G alanine mutants in VSVΔG viral particles, assessed using a polyclonal anti-VSV G and an anti-VSV M antibodies. **f** Neutralization of VSVΔG/GWT, VSVΔG/GD241A, and VSVΔG/GD243A by mAb (left panel) or FAb 8G5F11 (right panel). VSV pseudotypes were preincubated with increasing concentrations of mAb or Fab. At 16 hours *p.i.*, the percentage of infected cells was determined by counting the number of cells expressing eGFP using flow cytometry. This was used to calculate the infectious viral titer. Data depict the mean with standard error for experiments performed in triplicate. Average IC<sub>50</sub> were calculated and analyzed via unpaired t-test (right panel) for VSVΔG/GWT. Inverse log<sub>10</sub> of IC<sub>50</sub> is represented as mean ± SD (right panel), meaning that the lower the value, the higher the neutralizing concentration. Three independent experiments were performed, \*\*\* = p<0.001.

## Discussion:

In this work, we determined the structures of full-length VSV G, solubilized from viral particles, using cryo-EM SPA, both alone and in complex with the FAb derived from the neutralizing antibody 8G5F11. Overall, these G structures are largely consistent with those obtained by crystallography (Roche 2007, Roche 2006, Beilstein 2020) and correspond to the pre- and post-fusion conformation of VSV G. However, the cryo-EM structures of the post-fusion state of VSV G reveal new details about the organization of the CTD that were absent in previously reported post-fusion crystal structures of Vesiculovirus Gs (Baquero et al., 2015b; Roche et al., 2006). Since the CTD organization in the pre-fusion conformation was already known (Beilstein et al., 2020) and confirmed through the new cryo-EM structures of the pre-fusion form, this work shows that this domain also undergoes a major conformational change with a complete reorganization of secondary structures and a relocalization in a hydrophilic groove between two adjacent FDs. This organization of the CTD locks the post-fusion conformation and contributes to the stability of the post-fusion trimer. The correct positioning of the CTD within the hydrophilic groove is ensured by the hydrophobic patch formed by residues L423 and F425 with residue I82 of the same protomer and residues L105 and P107 of the adjacent protomer. The hydrophobic character of these residues is conserved among all Vesiculoviruses.

Previous studies have shown that the low pH-induced conformational change is initiated by refolding of the CTD (Baquero et al., 2017; Beilstein et al., 2020), which dissociates from the rest of the protomer, allowing the exposure of fusion loops at the top of the molecule, which enables its interaction with the target membrane. This work shows that the repositioning of the CTD that locks the post-fusion state occurs at a late stage of the refolding process in agreement with the crystal structures of intermediate conformations on the transition pathway of CHAV G and RABV G (Baquero et al., 2017; Yang et al., 2020).

Despite significant efforts, we were unable to visualize the TMD and ICD in the VSV G cryo-EM densities. This is in striking contrast to the fact that we were able to visualize the part of the FD inserted into the detergent micelle. This suggests that the TMD exhibits a high degree of mobility in the micelle and probably also in the membrane. This contrasts with the herpesvirus gBs for which the TMD is visible in the post-fusion structure of HSV1 gB (Cooper et al., 2018) and in the pre-fusion structure of gB of HCMV (Liu et al., 2021). It should be noted that the C-terminal part of the CTD corresponding to residues 432-446 for VSV G (missing in cryo-EM structures) is rather short compared to the corresponding Membrane Proximal External Region (MPER) of gBs which is approximately 50 residues long. The MPER of gB forms a flat-lying helical structure on the micelle that may contribute to stabilization of TMD orientation.

It has been suggested that flexibility between the ectodomain and the TMD is required for the proper refolding of viral fusion glycoproteins (Benton et al., 2018). This flexibility was demonstrated for the hemagglutinin (HA) of the influenza virus (Benton et al., 2018). However, in this case, despite the flexibility of HA, the trimeric organization of TMDs was visualized after masking the ectodomain. In contrast, using a similar approach for VSV G, we were unable to resolve its TMDs. Thus, this raises the possibility that VSV G TMDs may not associate into a trimeric structure. Supporting this hypothesis, tomographic reconstructions of VSV particles, showed no density potentially corresponding to TMDs (Zhou et al., 2022). Similarly, in the cryo-EM structure of rabies virus G (also solubilized with LMNG), the TMDs were indistinguishable, likely due to their high level of flexibility (Ng et al., 2022).

Our work also provides additionally the structures of VSV G in complex with FAb 8G5F11. VSV Indiana neutralizing mAb 8G5F11 cross-react with the glycoprotein of other Vesiculoviruses including Maraba, Alagoa, Cocal, and New Jersey (Munis et al., 2018). The structures revealed that the epitope recognized by the mAb corresponds to a helix of the PHD that is exposed at the top of G protomers in their pre-fusion conformation. This region corresponds also to the major antigenic site (major antigenic site II) of RABV (Benmansour et al., 1991; Prehaud et al., 1988). Three G residues (D241, K242, D243) from the core of the interface between G and the paratope, among which residues D241 and D243, are crucial for mAb binding and neutralization. Acidic residues in position 241 and 243 are conserved among Vesiculoviruses neutralized by 8G5F11, but they are absent in Piry virus G, which is not neutralized (Munis et al., 2018), as well as in Isfahan virus and CHAV Gs, which are other Vesiculoviruses of concern. It should be noted that CHAV G has not the same structural organization in this region: instead of a helix, it has a small  $\beta$ -hairpin (Baquero et al., 2015b).

The molecular mechanisms underlying this neutralization have not been investigated. However, it is plausible that the binding of the antibody creates a protein layer around the virion, increasing the distance between the virus and the cellular membrane, thus impeding receptor recognition (although the antibody does not bind directly to the receptor-binding site). Alternatively, it may interfere with the conformational changes required for membrane fusion (due to the proximity of the spikes in the viral membrane) or with the formation of the helical network of spikes in their post-fusion conformation that is supposed to play a role in the late stages of the fusion process (Libersou et al., 2010).

Although VSV and related viruses do not pose a major threat for human health, outbreaks in horses and livestock can cause economic losses. A better understanding of VSV neutralization may lead to the conception of vaccines protecting against a broad spectrum of Vesiculoviruses. Furthermore, VSV is a promising candidate for oncovirotherapy due to its ability to selectively replicate in and kill cancer cells

(Gao and Bergman, 2023; Geoffroy et al., 2024; Kottke et al., 2021). However, it still has the potential to spread uncontrollably in the bodies of patients whose immune systems have been weakened by other anticancer therapies. The administration of neutralizing human or humanized monoclonal antibodies could offer a potential solution in such cases.

## **Material and Methods:**

### **Viruses and cells**

BSR, a clone of BHK21 (Baby Hamster Kidney cells; ATC CCCL-10) and HEK-293T (human embryonic kidney cells expressing simian virus 40T antigen; ATCC CRL-3216) were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 50 U/mL of penicillin and 50 µg/mL of streptomycin at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Drosophila Schneider 2 (S2) cell line (Invitrogen) were grown in ESF 921 medium (Clinisciences) supplemented with 50 U/mL of penicillin and 50 µg/mL of streptomycin at 28° C.

Wild-type VSV MS (Mudd-Summer strain, Indiana serotype), VSVeGFP (a gift from Denis Gerlier) were propagated on BSR cells.

VSVΔG-GFP was propagated on HEK-293T cells that had been previously transfected with pCAGGS VSV G.

### **Plasmid and cloning**

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

### **Purification of VSV G protein**

VSV G protein was directly solubilized from concentrated stocks of VSV MS using 2% w/v laurylmaltose neopentyl glycol (LMNG; Anatrace) for 22 hours at 37°C. Insoluble material was removed by centrifugation (20 minutes at 20 000g, 4°C). The supernatant was then loaded onto an anion exchange chromatography column (ResourceQ, Cytiva) equilibrated with 20mM Tris-HCL pH 8.0, 2mM EDTA, 0.1 % w/v LMNG. VSV G was eluted with a linear gradient of NaCl (from 0 to 0.5 M NaCl). An additional purification step was performed on a size exclusion chromatography column (Superdex S200 increase

column HR10/300, Cytiva) equilibrated in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.005 % w/v LMNG. Purified VSV G was concentrated to 5 mg/ml (Amicon Ultra 30kDa cut of; Millipore) and stored at -80°C.

### **Production of recombinant FAb**

The heavy and light chains (HC and LC respectively) of 8G5F11 mAb were sequenced (Absoute antibody; <https://absoluteantibody.com/>) and then cloned into an insect cell expression vector derived from the pMT-puro plasmid (Addgene #17923) using Gibson assembly reaction kit (New England Biolabs), as described in (Backovic and Krey, 2016; Johansson et al., 2012). Briefly, the LC (light chain) is flanked by a metallothionein (MT) promoter and the Drosophila Bip secretion signal (BIP ss) at the N-terminus, with a poly A tail at the C-terminus. It is followed by the Fd portion of the heavy chain which is also flanked by MT promoter and BIP ss at the N-terminus, and an enterokinase-cleavable StrepTag II at the C-terminus, followed by a poly A tail (**Supplementary Fig. S5**).

### **Preparation of cryo-EM grids and data collection**

For VSV G samples, grids were prepared by applying 3.5  $\mu$ L of VSV G concentrated at 1.95 mg/mL to negatively glow discharged (25 mA, 45 s) UltraFoil<sup>®</sup> Au grids 300 R1.2/1.3 (QUANTIFOIL<sup>®</sup>) prior to plunge freezing using a Vitrobot Mark IV (FEI) (20°C, 100% humidity, 5.5 s blot time and blot force 0). To obtain VSV G in the post-fusion conformation, MES 1 M pH 5.5 was added to reach a final concentration of MES of 100 mM, sample was added 30 min at 37°C just before freezing. The grids were pre-screened on a 200 kV Glacios and automated data collection was performed at the beamline CM01 of ESRF (Grenoble, France) on a 300kV Titan Krios equipped with a K3 direct electron detector coupled to an energy filter (Bioquantum LS/967, Gatan Inc, USA) (Kandiah et al., 2019). 8,840 and 6,864 movies were recorded with EPU (ThermoFisher) for the pre- and post-fusion of VSV G respectively, with a pixel size of 1.05 Å/pixels, a total dose of 40,4 e-/Å and a defocus range of -0.8 to -2.2  $\mu$ m.

Cryo-EM grids of purified VSV G in complex with 8G5F11 FAb at pH 5.5 were prepared by applying 3.5  $\mu$ L of the complex at 0,83 mg/mL to negatively glow discharged (25 mA, 45 s) UltraFoil Au grids 300 R1.2/1.3 (QUANTIFOIL<sup>®</sup>) prior to plunge freezing using a Vitrobot Mark IV (FEI) (30°C, 100% humidity, 5,5 s blot time and blot force 0). The grids were pre-screened on a 200 kV Glacios electron microscope at IBS (Grenoble, France) and automated data collection was performed at the beamline CM01 of ESRF (Grenoble, France) on a 300 kV Titan Krios equipped with a K3 direct electron detector coupled to an energy filter (Bioquantum LS/967, Gatan Inc, USA) (Kandiah et al., 2019). 19,423 movies were recorded with EPU (ThermoFisher) for the pre- and post-fusion VSV G full length respectively, with pixel size of 0,84 Å/pixels, a total dose of 49,71 e-/Å and a defocus range of -0.8 to -2.2  $\mu$ m.

Cryo-EM grids of VSV G in complex with 8G5F11 FAb at pH 8,0 were prepared by applying 3.5  $\mu\text{L}$  of the complex at a concentration of 0,79 mg/mL to negatively glow discharged (25 mA, 45 s) UltraFoil Au grids 300 R1.2/1.3 (QUANTIFOIL®) prior to plunge freezing using a Vitrobot Mark IV (FEI) (30°C, 100% humidity, 5,5 s blot time and blot force 0). SerialEM based automated data collection was performed a 200 kV Glacios electron microscope equipped with a K2 summit direct electron detector. 15,947 movies were recorded with EPU (ThermoFisher) with pixel size of 1.145 Å/pixels, a total dose of 38,5 e-/Å and a defocus range of -0.8 to -2.2  $\mu\text{m}$ .

### **Cryo-EM data processing and model building**

Image processing was performed using cryoSPARC software (Punjani et al., 2017) and is summarized in **Supplementary figures S2-3 and S6-7**. Recorded movies were dose-weighted and motion-corrected using cryoSPARC Patch Motion Correction program. CTF parameters were determined using cryoSPARC Patch CTF program. Particles were at first automatically picked using circular and elliptical blobs with a diameter between 100 and 230 Å for VSV G pH 5.5, between 100 Å and 250 Å for VSV G pH 8.0, between 150 Å and 300 Å for VSV G/Fab pH 8.0 and 80 Å and 300 Å for VSVG/FAb pH 5.0. A first round of particles picking was performed for each data set to select correct side views 2D classes. Topaz neural network was then used to enrich particles data set in particles side views and visible micelle (Bepler et al., 2020). Several rounds of 2D classification were then performed in order to clean particle data sets. *Ab-initio* reconstruction was used to generate at least 2 models to classify particles among them. Several rounds of Homogeneous refinement and Non-uniform refinement (Punjani et al., 2020) were performed without imposed symmetry. The best models were selected for global and local (per-particle) CTF refinement to improve particle, map quality and resolution. C3 symmetry was only imposed on VSV pH8.0 and VSV/Fab pH5.0 reconstructions. Reported maps resolutions were estimated by gold-standard Fourier shell correlation (FSC) of 0.143 criterion.

Model building for all protein chains was performed using COOT v.0.9.6 EL (Emsley and Cowtan, 2004). Model refinement and validation was performed using Phenix v.1.20.1 (Adams et al., 2002; Liebschner et al., 2019) and ISOLDE (Croll, 2018). FAb model building was based on an initial protein model generated from AlphaFold2 (Jumper et al., 2021) then fitted into the cryo-EM map and manually refined in COOT v.0.9.6 EL (Emsley and Cowtan, 2004). Geometry was validated using MolProbity (Williams et al., 2018).

### **Biolayer interferometry analysis (BLI)**

BLI experiments were performed using an Octet® RED96e (Sartorius, Fremont, CA, USA) instrument operated at 20°C under 1000 rpm stirring with Octet BLI Discovery software (v.12.2.2.20). The 8G5F11 mAb was captured on Protein A-functionalized sensors at 20  $\mu\text{g/mL}$  during 40 seconds in acetate 10



mM pH 4.0. FAb 8G5F11 were covalently immobilized with random orientation on Amine Reactive 2nd Generation sensors (AR2G) at 20 µg/mL during 600 seconds in acetate 10 mM pH 4.0 using standard EDC-NHs chemistry. Interactions with VSV G<sub>ecto</sub>, from 6.25 to 150 nM in running buffer (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM), were monitored during 300 s (association phase). Dissociation step was set at 600 s on the mAb surfaces and 1200 seconds on the FAb surfaces respectively. A bare sensor was always added as a reference surface to control the non-specific binding.

Data analysis was performed on Octet Analysis Studio software (v.12.2.2.26) and kinetics constant ( $k_a$  and  $k_{dis}$ ) were extracted by fitting the data with a 1:1 binding model or a 2:1 heterogenous model, and equilibrium dissociation constant  $K_D$  was calculated.

The experiments were performed three times using similar values.

### **Binding assay of 8G5F11 mAb and FAb to HEK-293T expressing GWT or Gmut at their surface**

CR3-GST was produced in *E. Coli* (C41(DE3); Lucigen) and labeled with the fluorescent dye ATTO<sup>550</sup> NHS ester (Sigma Aldrich) following the instruction of the manufacturer, as previously described (Nikolic et al., 2018). The labelled probe was then diluted at a concentration of 50 mM and stored at -80°C until use. The labelling ratio was estimated to be around 2 dyes per CR3-GST molecules.

Cell surface expression levels of G WT or mutant G were estimated by adding GST-CR3 ATTO<sup>550</sup> at a concentration of 500 µM on transfected cells 24 hours post-transfection. The fluorescence of cells was measured using Beckman CytoFlex S cytometer.

For binding assays, HEK-293T cells were transfected with pCAGGS plasmids encoding G WT or G mutants using the calcium phosphate transfection method. Twenty-four hours after transfection, cells were collected and incubated with either 8G5F11 mAb (at a concentration of  $1.3 \cdot 10^{-3}$  mM) or 8G5F11 FAb (at a concentration of  $2.5 \cdot 10^{-5}$  mM) for 45 minutes at RT. Goat anti-mouse Alexa fluor 488 (at  $1,3 \cdot 10^{-3}$  mM) was added to the cells to accessed the binding of mAb 8G5F11. Anti-Strep coupled to PE fluorophore (5A9F9, GenScript) (at  $1 \cdot 10^{-3}$  mM) was added to the cells to accessed the binding of FAb 8G5F11. The fluorescence of cells was measured using a Beckman CytoFlex S cytometer.

### **Virus neutralization assay**

HEK-293T cells at 70% confluence in 96-well plates were infected at MOI 1 with VSV G-eGFP pre-incubated for 30 minutes with increasing concentrations of 8G5F11 mAb or FAb.  $10^5$  VSVeGFP pfu were incubated with increasing concentrations of 8G5F11 Mab or Fab for 30 minutes. The percentage of infected cells (eGFP-positive) was determined using a Beckman CytoFlex S cytometer, 5 hours *p.i.*

### **VSVΔG-GFP pseudotypes neutralization assay**

HEK-293T cells at 70% confluence were transfected with pCAGGS plasmids encoding G WT or mutant G using the calcium phosphate transfection method. Twenty-four hours after transfection, cells were infected with VSVΔG-GFP pseudotyped by VSV G WT at MOI 1. Two hours *p.i.*, cells were washed to remove the inoculum. Then, at 16 hours *p.i.*, supernatants containing the pseudotypes were collected. The infectious titers of the pseudotyped viruses was determined on non-transfected cells by counting cells expressing the GFP using a Beckman CytoFlex S cytometer 16 hours *p.i.*. Experimental MOIs were precisely determined using the equation  $MOI = -\ln[p(0)]$ , where  $p(0)$  is the proportion of non-infected cells, and compared to that of VSVΔG-GFP pseudotyped with WT G which was normalized to 1.

### **Western blot analysis**

G WT and mutant G incorporation into the membrane of the pseudotyped particles was assessed, after concentrating viral supernatants, by Western blot analysis using P5D4, a mouse-monoclonal anti-VSV G antibody directed against the ICD of VSV G (1/5000) and a mouse-monoclonal anti-VSV M antibody (1/5000). Goat anti-rabbit DyLight 800 conjugate and Goat anti-mouse DyLigth 680 conjugate were used as secondary antibodies. Blots were imaged using a LI-COR Biosciences Odyssey®.

### **Statistical analysis**

All numerical data were calculated and plotted with mean  $\pm$ SD resulting from three independent biological replicates. Results were analyzed using Prism v8.0.1 (GraphPad Software).

For the recognition assay, results are presented as normalized MFI. To do so, the geometric mean of the measured MFI for each condition of each experimental replicate was calculated. The geometric means were then normalized to the one of the WT. Results were compared using T-tests to compare means of biological replicates. Experiments were performed in triplicates.

For neutralization and pseudotypes assays, experimental titers were determined based on experimental MOIs. Dose-response parameters, namely Hillslope and  $IC_{50}$ , were determined using a log(inhibitor) vs response – variable slope model. The inverse logs of  $IC_{50}$  were plotted to compare the sensitivity of VSV-eGFP or VSV GWT pseudotypes viruses to mAb and FAB forms of 8G5F11.

### **Acknowledgments**

We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of beamtime on CM01 (proposal number MX-2440), and we thank A. Grinzato for assistance in using the beamline. The IBS/ISBG electron microscope facility is supported by the Auvergne-Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Médicale (FRM), the fonds FEDER, and the GIS-473 Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBISA). This research used the platforms of the Grenoble Instruct center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB).

## References:

- Adams PD, Grosse-Kunstleve RW, Hung L, Ioerger TR, McCoy AJ, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK, Terwilliger TC. 2002. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr Sect D* 58:1948–1954. doi:10.1107/s0907444902016657
- Albertini AA, Merigoux C, Libersou S, Madiona K, Bressanelli S, Roche S, Lepault J, Melki R, Vachette P, Gaudin Y. 2012. Characterization of monomeric intermediates during VSV glycoprotein structural transition. *PLoS Pathog* 8:e1002556. doi:10.1371/journal.ppat.1002556
- Backovic M, Jardetzky TS. 2009. Class III viral membrane fusion proteins. *Curr Opin Struct Biol* 19:189–96. doi:10.1016/j.sbi.2009.02.012
- Backovic M, Krey T. 2016. Stable Drosophila Cell Lines: An Alternative Approach to Exogenous Protein Expression. *Methods Mol Biol* 1350:349–58. doi:10.1007/978-1-4939-3043-2\_17
- Baquero E, Albertini AA, Gaudin Y. 2015a. Recent mechanistic and structural insights on class III viral fusion glycoproteins. *Curr Opin Struct Biol* 33:52–60. doi:10.1016/j.sbi.2015.07.011
- Baquero E, Albertini AA, Raux H, Abou-Hamdan A, Boeri-Erba E, Ouldali M, Buonocore L, Rose JK, Lepault J, Bressanelli S, Gaudin Y. 2017. Structural intermediates in the fusion-associated transition of vesiculovirus glycoprotein. *EMBO J* 36:679–692. doi:10.15252/emj.201694565
- Baquero E, Albertini AA, Raux H, Buonocore L, Rose JK, Bressanelli S, Gaudin Y. 2015b. Structure of the low pH conformation of Chandipura virus G reveals important features in the evolution of the vesiculovirus glycoprotein. *PLoS Pathog* 11:e1004756. doi:10.1371/journal.ppat.1004756
- Beilstein F, Hamdan AA, Raux H, Belot L, Ouldali M, Albertini AA, Gaudin Y. 2020. Identification of a pH-Sensitive Switch in VSV-G and a Crystal Structure of the G Pre-fusion State Highlight the VSV-G Structural Transition Pathway. *Cell Rep* 32:108042. doi:10.1016/j.celrep.2020.108042
- Belot L, Albertini A, Gaudin Y. 2019. Structural and cellular biology of rhabdovirus entry. *Adv Virus Res* 104:147–183. doi:10.1016/bs.aivir.2019.05.003
- Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flamand A, Lafay F. 1991. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* 65:4198–4203. doi:10.1128/jvi.65.8.4198-4203.1991
- Benton DJ, Nans A, Calder LJ, Turner J, Neu U, Lin YP, Ketelaars E, Kallewaard NL, Corti D, Lanzavecchia A, Gamblin SJ, Rosenthal PB, Skehel JJ. 2018. Influenza hemagglutinin membrane anchor. *Proc Natl Acad Sci* 115:10112–10117. doi:10.1073/pnas.1810927115
- Bepler T, Kelley K, Noble AJ, Berger B. 2020. Topaz-Denoise: general deep denoising models for cryoEM and cryoET. *Nat Commun* 11:5208. doi:10.1038/s41467-020-18952-1
- Breyton C, Javed W, Vermot A, Arnaud C-A, Hajjar C, Dupuy J, Petit-Hartlein I, Roy AL, Martel A, Thépaut M, Orelle C, Jault J-M, Fieschi F, Porcar L, Ebel C. 2019. Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Biomembr* 1861:939–957. doi:10.1016/j.bbmem.2019.02.003
- Ci Y, Yang Y, Xu C, Shi L. 2018. Vesicular stomatitis virus G protein transmembrane region is crucial for the hemi-fusion to full fusion transition. *Sci Rep* 8:10669. doi:10.1038/s41598-018-28868-y

- Cleverley DZ, Lenard J. 1998. The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci* 95:3425–30. doi:10.1073/pnas.95.7.3425
- Cooper RS, Georgieva ER, Borbat PP, Freed JH, Heldwein EE. 2018. Structural basis for membrane anchoring and fusion regulation of the herpes simplex virus fusogen gB. *Nat Struct Mol Biol* 25:416–424. doi:10.1038/s41594-018-0060-6
- Croll TI. 2018. ISOLDE: a physically realistic environment for model building into low-resolution electron-density maps. *Acta Crystallogr Sect D* 74:519–530. doi:10.1107/s2059798318002425
- Cureton DK, Massol RH, Saffarian S, Kirchhausen TL, Whelan SPJ. 2009. Vesicular Stomatitis Virus Enters Cells through Vesicles Incompletely Coated with Clathrin That Depend upon Actin for Internalization. *PLoS Pathog* 5:e1000394. doi:10.1371/journal.ppat.1000394
- Dennison SM, Greenfield N, Lenard J, Lentz BR. 2002. VSV Transmembrane Domain (TMD) Peptide Promotes PEG-Mediated Fusion of Liposomes in a Conformationally Sensitive Fashion †. *Biochemistry* 41:14925–14934. doi:10.1021/bi0203233
- Doms RW, Keller DS, Helenius A, Balch WE. 1987. Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *J cell Biol* 105:1957–1969. doi:10.1083/jcb.105.5.1957
- Emsley P, Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr* 60:2126–2132. doi:10.1107/s0907444904019158
- Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. 2013. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci* 110:7306–11. doi:10.1073/pnas.1214441110
- Gao Y, Bergman I. 2023. Vesicular Stomatitis Virus (VSV) G Glycoprotein Can Be Modified to Create a Her2/Neu-Targeted VSV That Eliminates Large Implanted Mammary Tumors. *J Virol* 97:e00372-23. doi:10.1128/jvi.00372-23
- Gaudin Y. 2002. Fusion of Biological Membranes and Related Problems. *Subcell Biochem* 34:379–408. doi:10.1007/0-306-46824-7\_10
- Gaudin Y. 2000. Rabies Virus-Induced Membrane Fusion Pathway. *J Cell Biology* 150:601–612. doi:10.1083/jcb.150.3.601
- Gaudin Y, Ruigrok RW, Knossow M, Flamand A. 1993. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol* 67:1365–1372. doi:10.1128/jvi.67.3.1365-1372.1993
- Geoffroy K, Mullins-Dansereau V, Leclerc-Desaulniers K, Viens M, Bourgeois-Daigneault M-C. 2024. Oncolytic vesicular stomatitis virus alone or in combination with JAK inhibitors is effective against ovarian cancer. *Mol Ther Oncol* 32:200826. doi:10.1016/j.omton.2024.200826
- Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Harrison SC. 2006. Crystal Structure of Glycoprotein B from Herpes Simplex Virus 1. *Science* 313:217–220. doi:10.1126/science.1126548

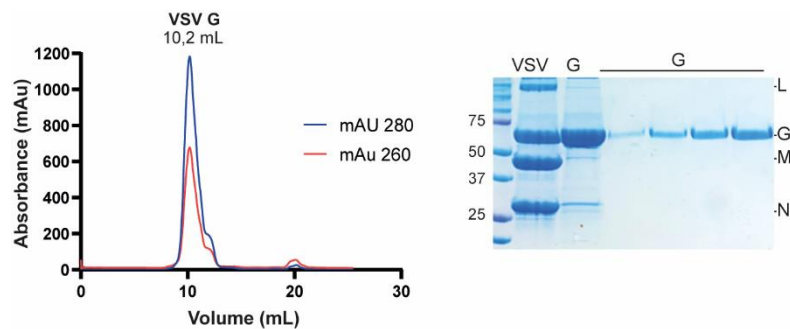
- Johannsdottir HK, Mancini R, Kartenbeck J, Amato L, Helenius A. 2009. Host Cell Factors and Functions Involved in Vesicular Stomatitis Virus Entry. *J Virol* 83:440–453. doi:10.1128/jvi.01864-08
- Johansson DX, Krey T, Andersson O. 2012. Antibody Engineering, Methods and Protocols, Second Edition. *Methods Mol Biol* 907:359–370. doi:10.1007/978-1-61779-974-7\_21
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596:583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
- Kadlec J, Loureiro S, Abrescia NG, Stuart DI, Jones IM. 2008. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nat Struct Mol Biol* 15:1024–30. doi:10.1038/nsmb.1484
- Kandiah, E., Giraud, T., de Maria Antolinos, A., Dobias, F., Effantin, G., Flot, D., Hons, M., Schoehn, G., Susini, J., Svensson, O., Leonard, G. A., & Mueller-Dieckmann, C. (2019). CM01: a facility for cryo-electron microscopy at the European Synchrotron. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology*, 75(Pt 6), 528–535. <https://doi.org/10.1107/S2059798319006880>
- Kim IS, Jenni S, Stanifer ML, Roth E, Whelan SPJ, Oijen AM van, Harrison SC. 2017. Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci* 114:E28–E36. doi:10.1073/pnas.1618883114
- Kottke T, Tonne J, Evgin L, Driscoll CB, Vloten J van, Jennings VA, Huff AL, Zell B, Thompson JM, Wongthida P, Pulido J, Schuelke MR, Samson A, Selby P, Ilett E, McNiven M, Roberts LR, Borad MJ, Pandha H, Harrington K, Melcher A, Vile RG. 2021. Oncolytic virotherapy induced CSDE1 neoantigenesis restricts VSV replication but can be targeted by immunotherapy. *Nat Commun* 12:1930. doi:10.1038/s41467-021-22115-1
- Lefrancois L, Lyles DS. 1983. Antigenic determinants of vesicular stomatitis virus: analysis with antigenic variants. *J Immunol* 130:394–398. doi:10.4049/jimmunol.130.1.394
- Libersou S, Albertini AAV, Ouldali M, Maury V, Maheu C, Raux H, Haas F de, Roche S, Gaudin Y, Lepault J. 2010. Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion. *J Cell Biol* 191:199–210. doi:10.1083/jcb.201006116
- Liebschner D, Afonine PV, Baker ML, Bunkóczi G, Chen VB, Croll TI, Hintze B, Hung L-W, Jain S, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner RD, Poon BK, Prisant MG, Read RJ, Richardson JS, Richardson DC, Sammito MD, Sobolev OV, Stockwell DH, Terwilliger TC, Urzhumtsev AG, Videau LL, Williams CJ, Adams PD. 2019. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr Sect D* 75:861–877. doi:10.1107/s2059798319011471
- Liu Y, Heim KP, Che Y, Chi X, Qiu X, Han S, Dormitzer PR, Yang X. 2021. Prefusion structure of human cytomegalovirus glycoprotein B and structural basis for membrane fusion. *Sci Adv* 7:eabf3178. doi:10.1126/sciadv.abf3178
- Munis AM, Tijani M, Hassall M, Mattiuzzo G, Collins MK, Takeuchi Y. 2018. Characterization of Antibody Interactions with the G Protein of Vesicular Stomatitis Virus Indiana Strain and Other Vesiculovirus G Proteins. *J Virol* 92:e00900-18. doi:10.1128/jvi.00900-18

- Ng WM, Fedosyuk S, English S, Augusto G, Berg A, Thorley L, Haselon A-S, Segireddy RR, Bowden TA, Douglas AD. 2022. Structure of trimeric pre-fusion rabies virus glycoprotein in complex with two protective antibodies. *Cell Host Microbe* 30:1219-1230.e7. doi:10.1016/j.chom.2022.07.014
- Nikolic J, Belot L, Raux H, Legrand P, Gaudin Y, A AA. 2018. Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nat Commun* 9:1029. doi:10.1038/s41467-018-03432-4
- Pelzel-McCluskey AM. 2024. Vesicular Stomatitis Virus. *Vet Clin North Am: Food Anim Pr* 40:251–259. doi:10.1016/j.cvfa.2024.01.005
- Prehaud C, Coulon P, LaFay F, Thiers C, Flamand A. 1988. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J Virol* 62:1–7. doi:10.1128/jvi.62.1.1-7.1988
- Punjani A, Rubinstein JL, Fleet DJ, Brubaker MA. 2017. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat Methods* 14:290–296. doi:10.1038/nmeth.4169
- Punjani A, Zhang H, Fleet DJ. 2020. Non-uniform refinement: adaptive regularization improves single-particle cryo-EM reconstruction. *Nat Methods* 17:1214–1221. doi:10.1038/s41592-020-00990-8
- Roche S, Albertini AAV, Lepault J, Bressanelli S, Gaudin Y. 2008. Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell Mol Life Sci* 65:1716–1728. doi:10.1007/s00018-008-7534-3
- Roche S, Bressanelli S, Rey FA, Gaudin Y. 2006. Crystal Structure of the Low-pH Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* 313:187–191. doi:10.1126/science.1127683
- Roche S, Gaudin Y. 2002. Characterization of the Equilibrium between the Native and Fusion-Inactive Conformation of Rabies Virus Glycoprotein Indicates That the Fusion Complex Is Made of Several Trimers. *Virology* 297:128–135. doi:10.1006/viro.2002.1429
- Roche S, Rey FA, Gaudin Y, Bressanelli S. 2007. Structure of the Prefusion Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* 315:843–848. doi:10.1126/science.1135710
- Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, Verma V, Keedy DA, Hintze BJ, Chen VB, Jain S, Lewis SM, Arendall WB, Snoeyink J, Adams PD, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC. 2018. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci* 27:293–315. doi:10.1002/pro.3330
- Yang F, Lin S, Ye F, Yang J, Qi J, Chen Z, Lin X, Wang J, Yue D, Cheng Y, Chen Z, Chen H, You Y, Zhang Z, Yang Y, Yang M, Sun H, Li Y, Cao Y, Yang S, Wei Y, Gao GF, Lu G. 2020. Structural Analysis of Rabies Virus Glycoprotein Reveals pH-Dependent Conformational Changes and Interactions with a Neutralizing Antibody. *Cell Host Microbe* 27:441-453 e7. doi:10.1016/j.chom.2019.12.012
- Zagouras P, Rose JK. 1993. Dynamic equilibrium between vesicular stomatitis virus glycoprotein monomers and trimers in the Golgi and at the cell surface. *J Virol* 67:7533–7538. doi:10.1128/jvi.67.12.7533-7538.1993
- Zhou K, Si Z, Ge P, Tsao J, Luo M, Zhou ZH. 2022. Atomic model of vesicular stomatitis virus and mechanism of assembly. *Nat Commun* 13:5980. doi:10.1038/s41467-022-33664-4

## SUPPLEMENTALS:

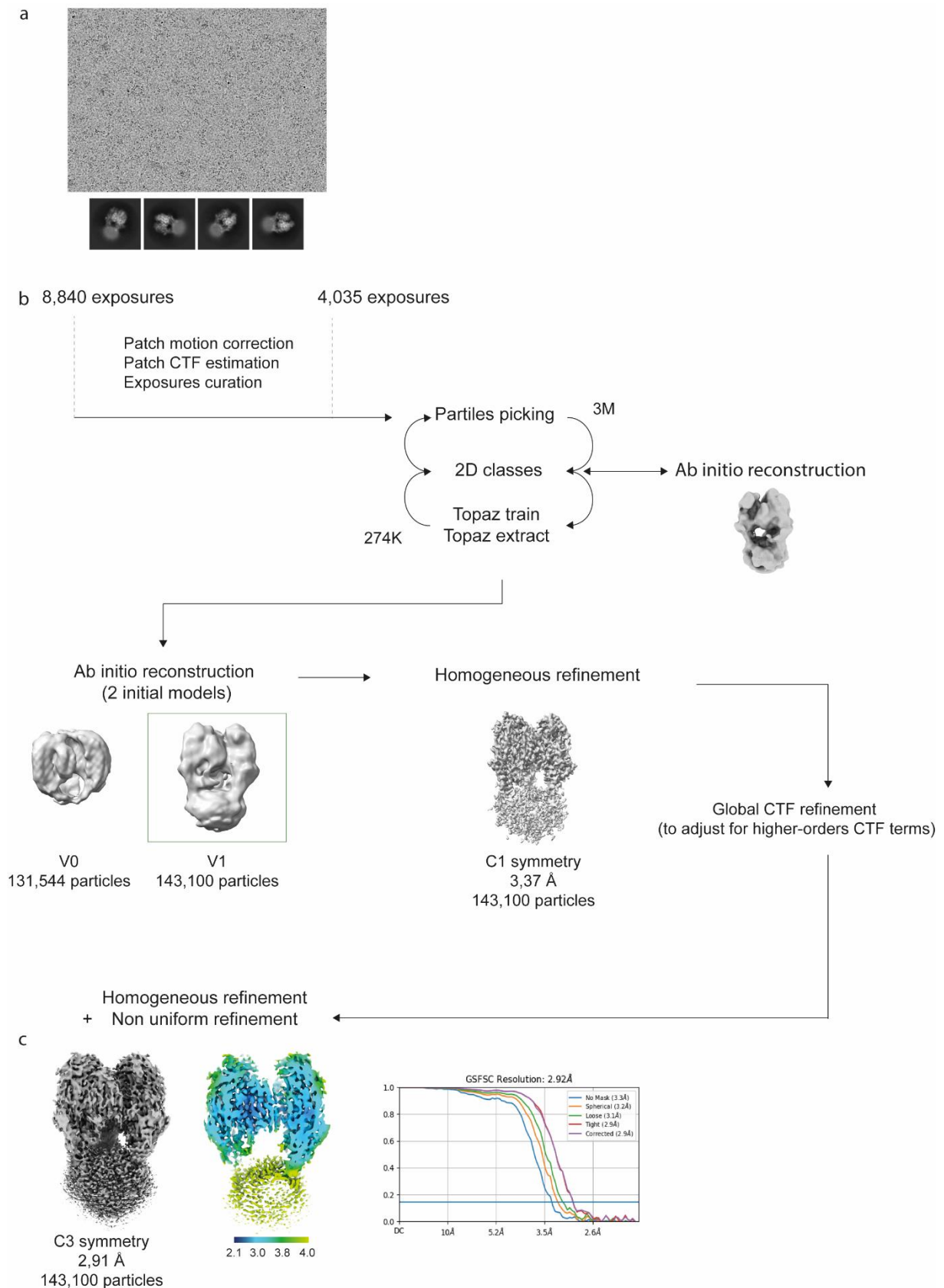
Domaine structural	Nombre de résidus	VSVG post-fusion / 5i2m	VSVG pré-fusion / 6tit
FD	120 (53-173)	0,549 (108 Ca)	0,500 (99 Ca)
PHD	92 (35-47 et 180-260)	0,492 (88 Ca)	0,431 (82 Ca)
TrD	127 (1-18 et 272-382)	0,430 (119 Ca)	0,403 (121 Ca)
<b>Complete structure</b>	426	0,664 (366 Ca)	0,634 (369 Ca)

**Table S1 Structural alignment of crystallographic and cryo-EM structures of VSV G**



**Fig. S1 Purification of VSV G**

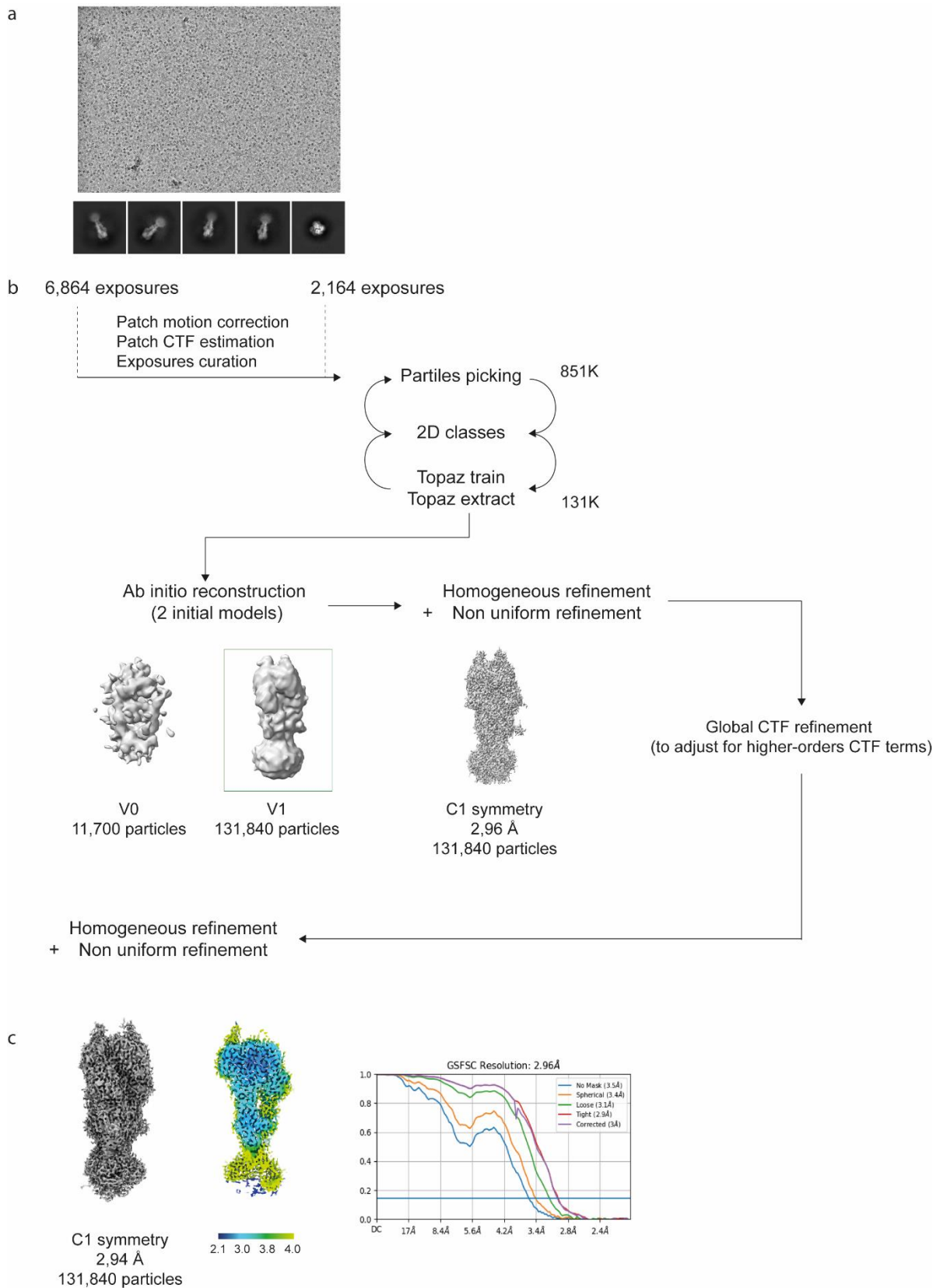
Elution profile of VSV G on a Superdex S200 HR 10/300 (cytiva) in 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl 2 mM EDTA (left panel) and Coomassie-stained SDS-PAGE of purified VSV G obtained from concentrated VSV preparation (lane 1), following anion exchange chromatography (lane 2) and size exclusion chromatography (lanes 3-6).



**Fig. S2 Cryo-EM data processing pipeline for VSV G at pH 8.0**

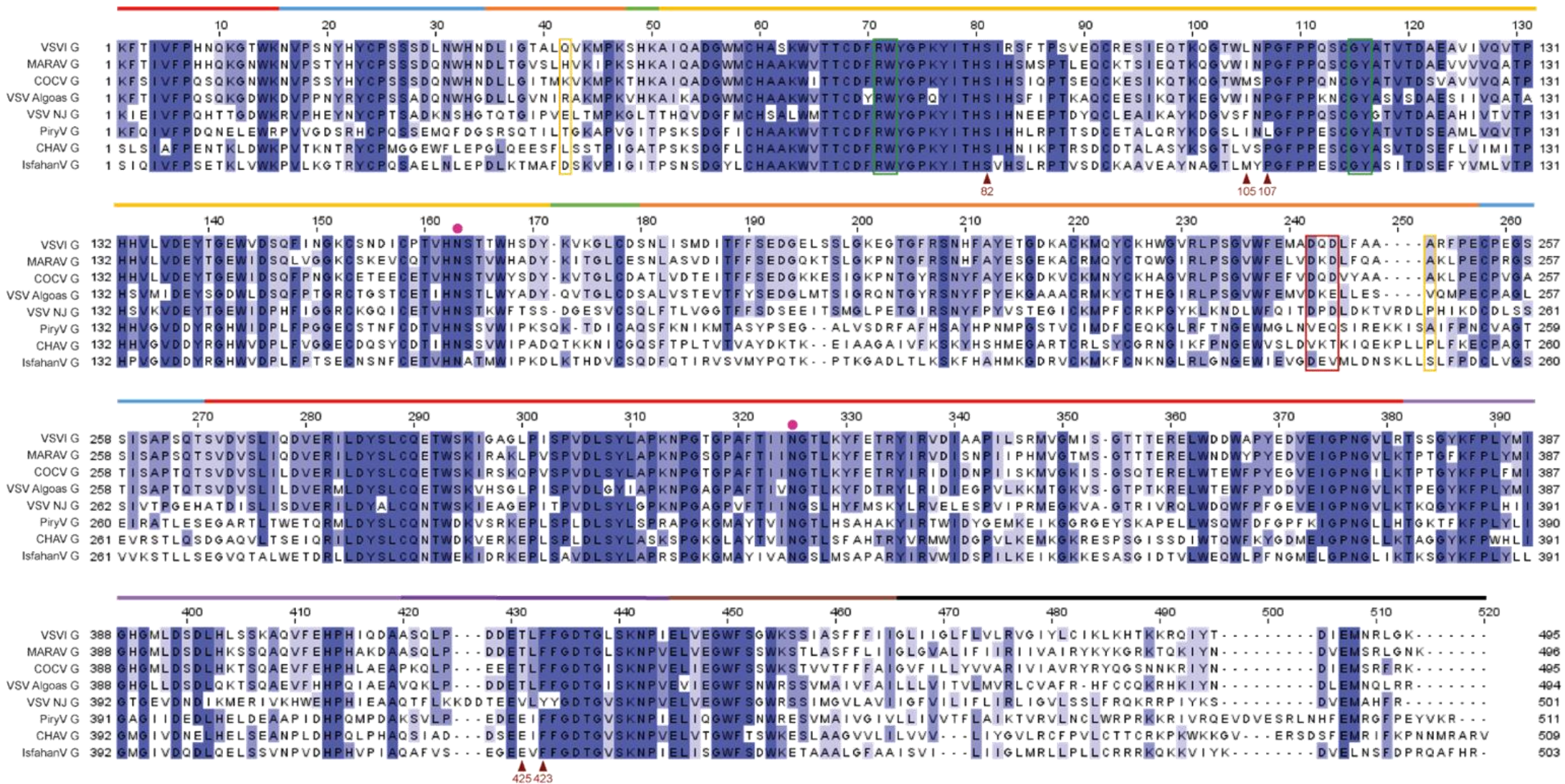
**a** Representative cryo electron micrograph. **b** Cryo-EM data processing workflow in cryoSPARC. **c** Final density used for model building (left) and local resolution map calculated and plotted onto the sharpened VSV G reconstruction.





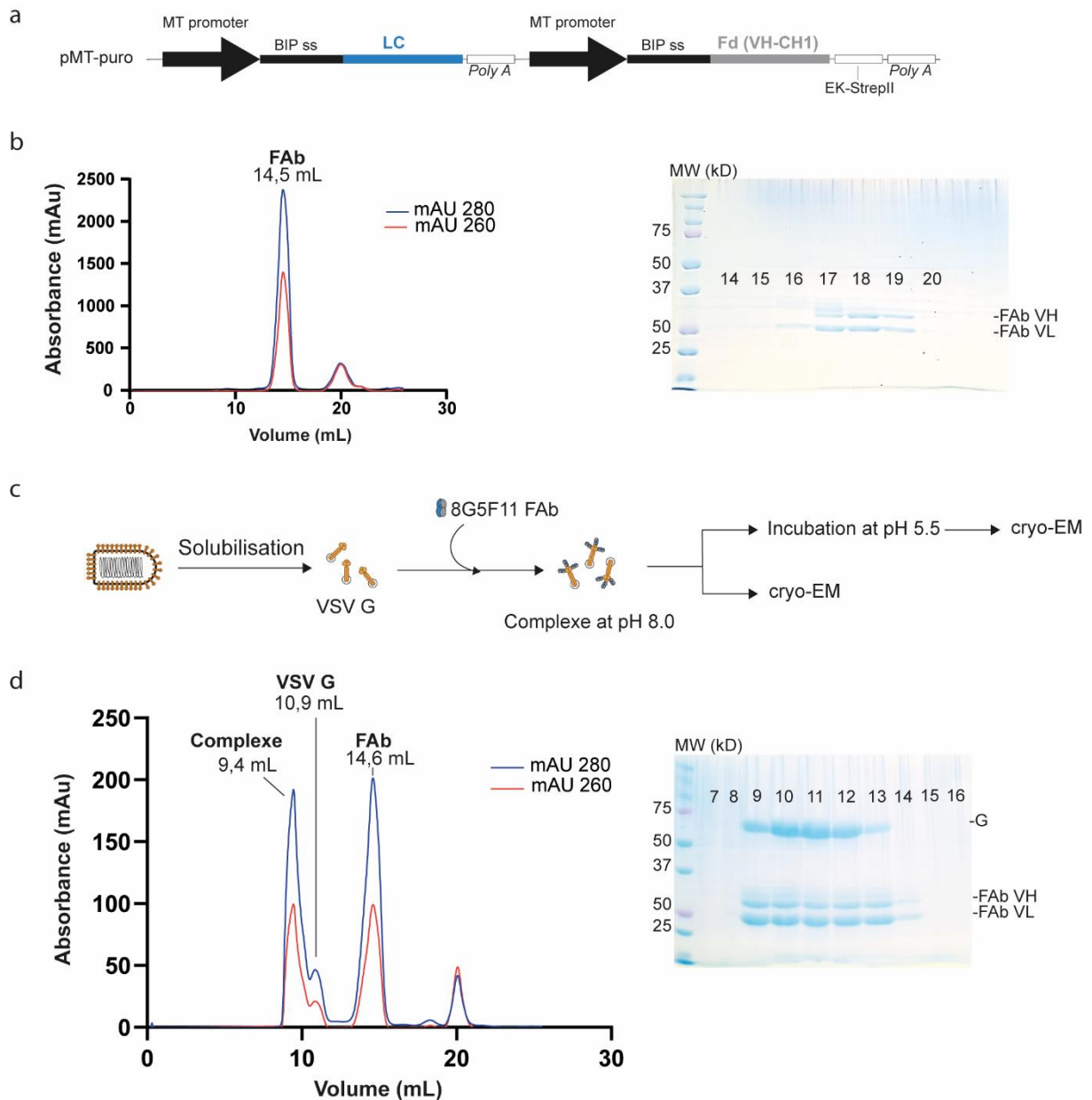
**Fig. S3 Cryo-EM data processing pipeline for VSV G at pH 5.5**

**a** Representative cryo electron micrograph. **b** Cryo-EM data processing workflow in cryoSPARC. **c** Final density used for model building (left) and local resolution map calculated and plotted onto the sharpened VSV G reconstruction



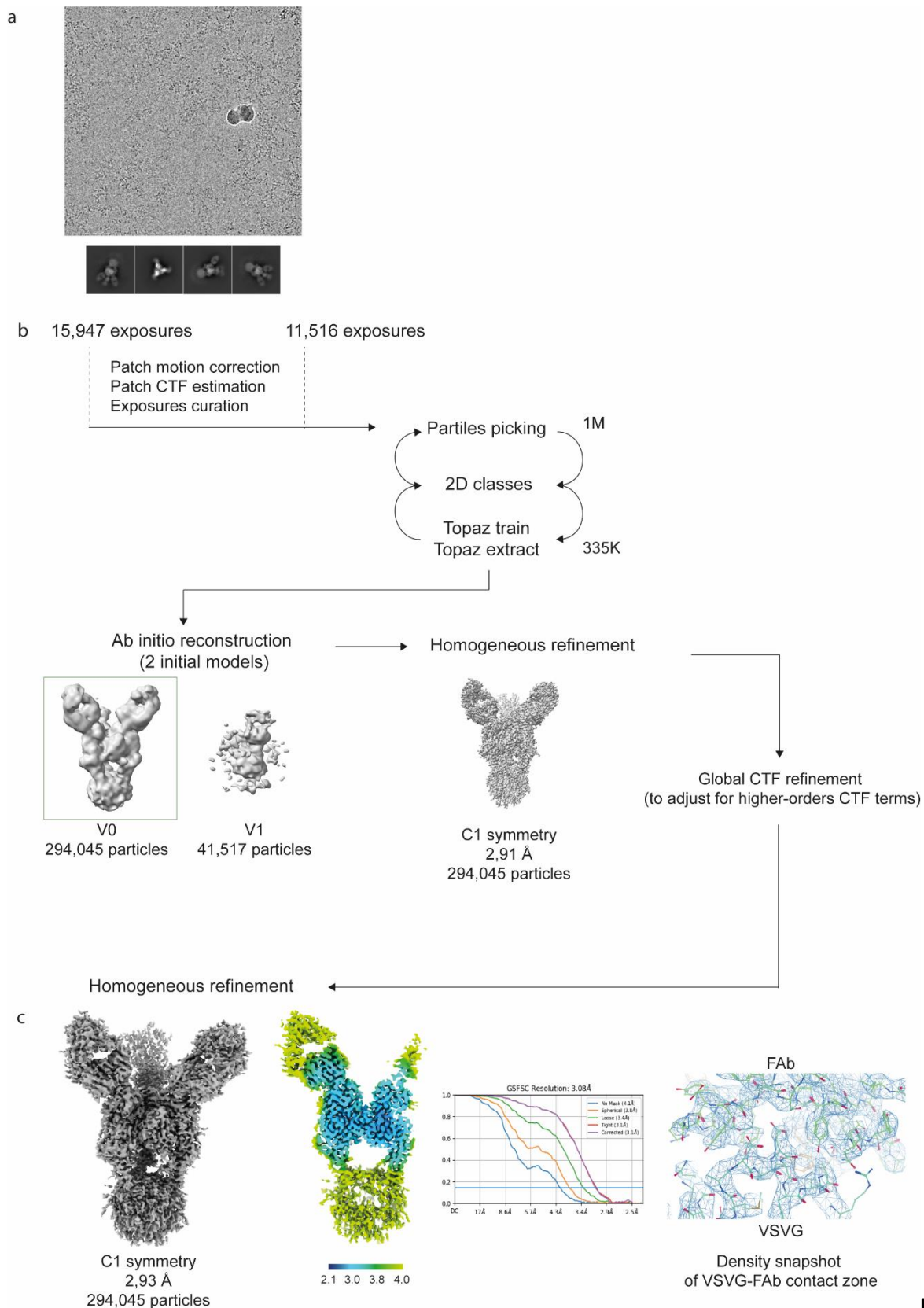
**Fig. S4 Sequence alignment of Vesiculovirus glycoproteins**

Conserved residues are highlighted in dark blue boxes, while similar residues are shown in lighter blue. Domains are depicted according to Fig. 1a color code. Asparagines carrying N-glycosylation are marked with a pink circle. Hydrophobic residues constituting the fusion loops are outlined in green. Residues implicated in the epitope recognized by 8G5F11 are framed in red and yellow. Positions contributing to the hydrophobic patch stabilizing the CTD are indicated by brown arrows.



**Fig. S5 Purification of VSV G-Fab complex for cryo-EM studies**

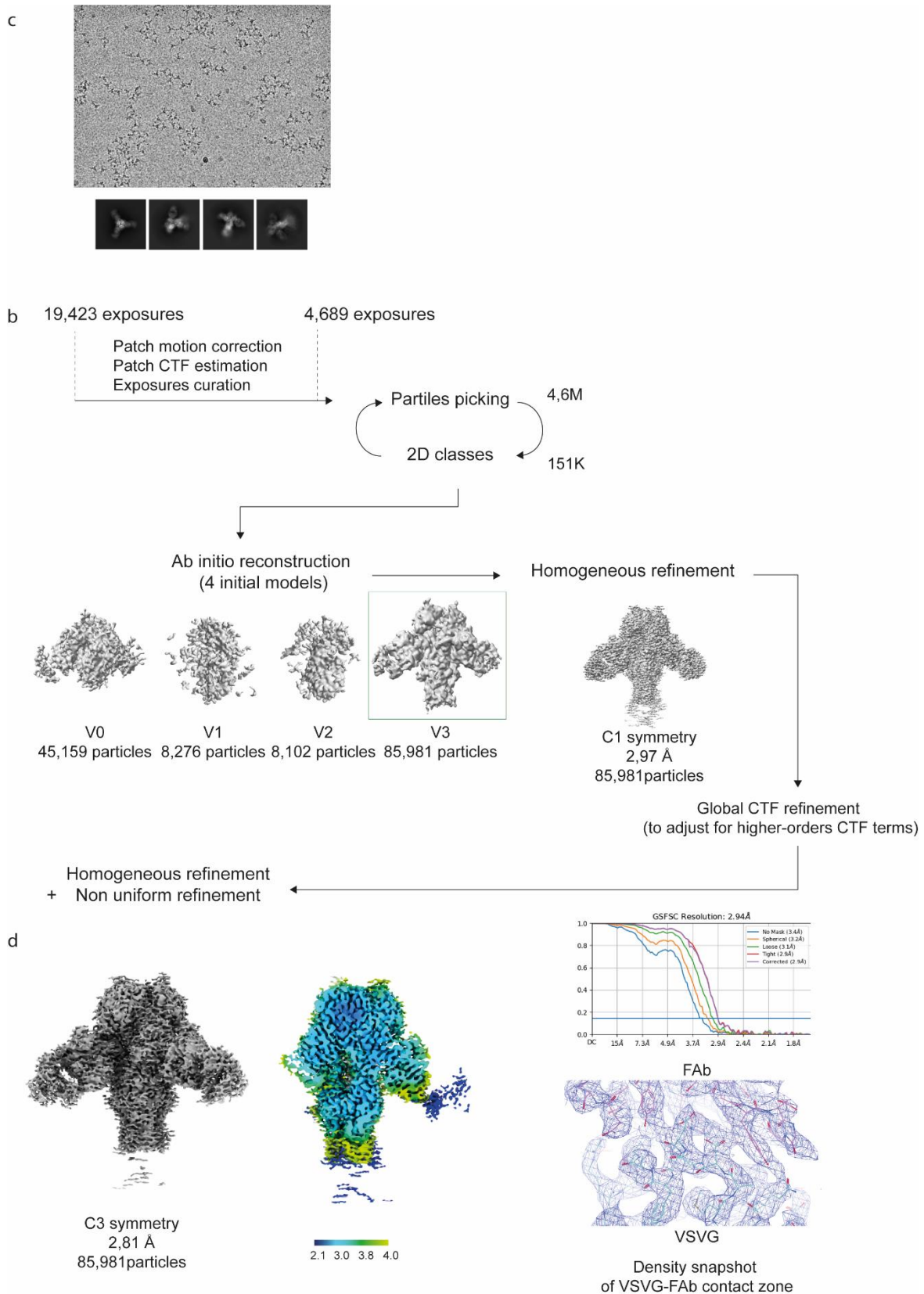
**a** Diagram of the construction used to produce 8G5F11Fab. (BIP ss = BIP signal sequence; LC = light chain; Fd = part of the heavy chain composing the Fab; EK-StrepII = enterokinase cleavage site with strep-tag II). **b** Elution profile of FAB on a Superdex S200 HR 10/300 (Cytiva) in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl 2 mM EDTA (left panel) and Coomassie-stained SDS-PAGE analysis of purified FAB. **c** Schematic description of VSVG-Fab complex assembly for cryo-EM studies. **d** Elution profile of VSVG-Fab complex on a Superdex S200 HR 10/300 (Cytiva) in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl 2 mM EDTA (left panel) and Coomassie-stained SDS-PAGE analysis of purified VSVG-Fab.



**Fig.**

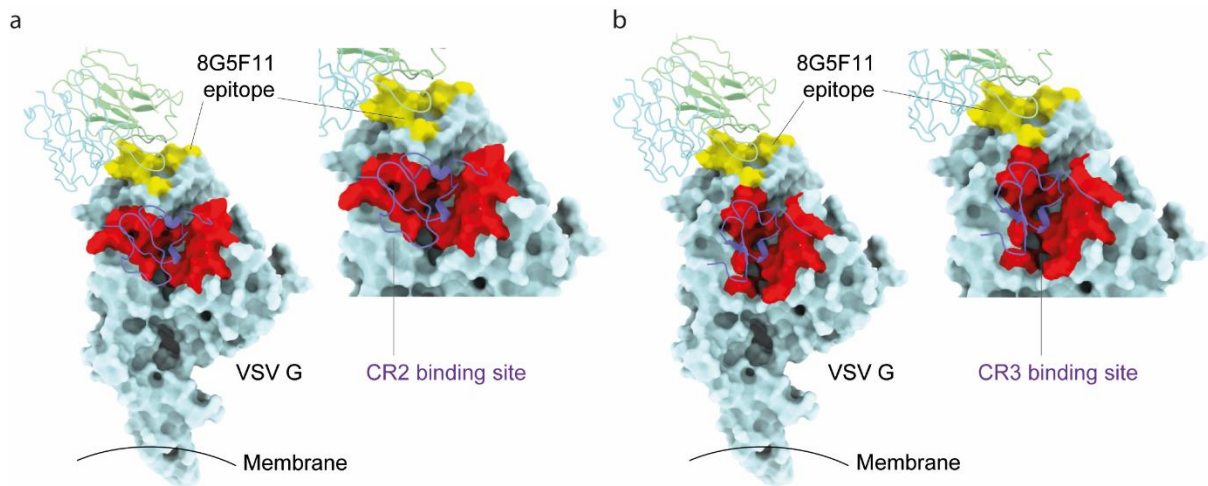
**S6 Cryo-EM data processing pipeline for pre-fusion VSV G at pH 8.0 in complex with FAb**

**a** Representative cryo electron micrograph. **b** Cryo-EM data processing workflow in cryoSPARC. **c** Final density used for model building (left panel) and local resolution map calculated and plotted onto the sharpened VSV G reconstruction (middle panel) and representative fit of atomic model of G and FAb into density (right panel).



**Fig. S7 Cryo-EM data processing pipeline for pre-fusion VSV G at pH 5.5 in complex with FAb**

**a** Representative cryo electron micrograph. **b** Cryo-EM data processing workflow in cryoSPARC. **c** Final density used for model building (left panel) and local resolution map calculated and plotted onto the sharpened VSV G reconstruction (upper right panel) and representative fit of atomic model of G and FAb into density (lower right panel).



**Fig. S8 Comparison of 8G5F11 and LDL-R binding sites on VSV G**  
 Binding footprint of 8G5F11 and CR2 (a) or CR3 (b) on VSV G.

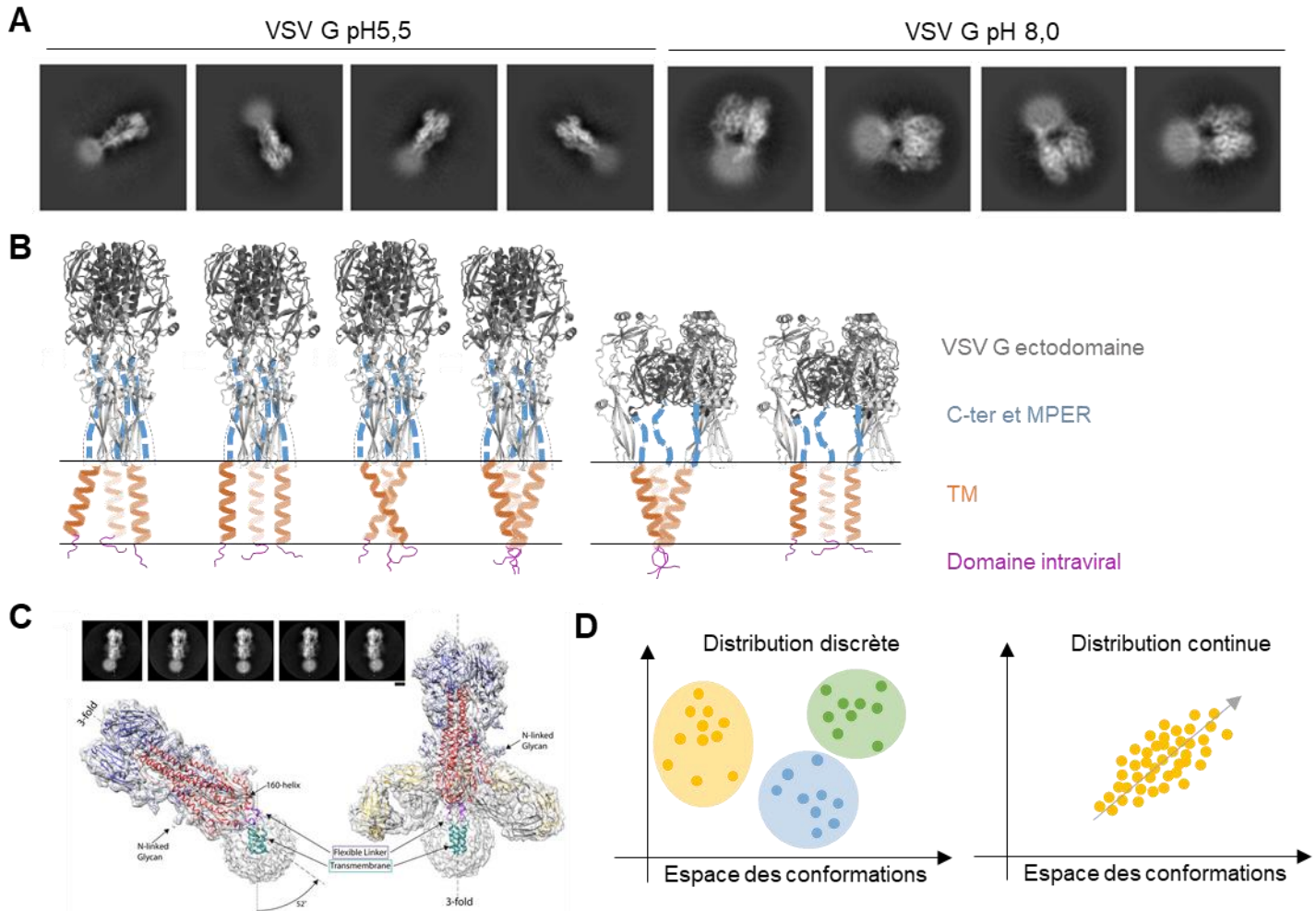
## **II. Compléments sur l'étude de VSV G entière - à la recherche du domaine transmembranaire de G**

Dans cette partie, des précisions sur le traitement SPA des données de cryo-EM sont apportées. En particulier, le traitement SPA autour de la micelle de VSV G, et donc la recherche de son TM, est présentée.

Le traitement SPA (*single particle analysis*) a été réalisé sur le logiciel CryoSPARC v.3 (Pujani et al., 2017). Au cours de la reconstruction par SPA de VSV G entière, aucune densité clairement identifiable au niveau de la micelle de détergent n'est ressortie, ne permettant pas de résoudre la structure de la totalité du CTD, du TMD et du domaine intraviral (ICD) de VSV G (**Figure 38.A**). Cela traduit notamment une flexibilité importante des trois domaines. Deux hypothèses ont été émises lors du traitement SPA sur la nature de cette flexibilité. Dans un cas, les TMDs, au sein de la micelle, adoptent une conformation stable (les potentielles hélices des trois TMDs interagiraient entre elles) mais présenteraient une variété d'angles par rapport à l'ectodomaine de VSV G (**Figure 38.B**) ; cela a notamment été décrit pour le TMD de HA du virus Influenza par exemple (Benton et al., 2018) (**Figure 38.C**). Il s'agirait dans ce cas d'une flexibilité discrète, composée d'un nombre fini de conformations de G (**Figure 38.D**). Dans l'autre cas, les hélices des trois TMDs n'interagissent pas entre elles et seraient donc individuellement mobiles au sein de la micelle de détergent (**Figure 38.B**). La densité propre à chaque hélice n'est alors pas suffisante pour être identifiée au cours des étapes d'alignement des particules. Il s'agit dans ce cas d'une flexibilité continue : il existe un continuum de conformations que les trois hélices adoptent au sein de la micelle de détergent (**Figure 38.D**).

D'un point de vue informatique et statistique, ce problème d'hétérogénéité se traduit de la façon suivante. Dans l'espace des conformations que peut adopter une protéine, chaque image de cryo-EM de la protéine acquise correspond à un point de cet espace (**Figure 38.D**). Dans le cas d'une hétérogénéité discrète, les images des particules forment des clusters : les images similaires à une structure 3D sont regroupées au sein d'un cluster (**Figure 38.D**). Dans le cas d'une hétérogénéité continue, toutes les particules sont regroupées dans un *manifold*, i.e. une surface multi-dimensionnelle, dans laquelle ces particules varient selon une ou plusieurs directions, ces directions pouvant correspondre à une certaine flexibilité au sein de la protéine (**Figure 38.D**). Pour explorer l'espace dans lequel sont présentes les particules et leur arrangement dans cet espace, plusieurs méthodes sont actuellement disponibles, dont trois qui sont présentées ici : la classification 3D, qui permet d'explorer l'hétérogénéité discrète au sein d'un échantillon, 3DVA, qui permet d'explorer l'hétérogénéité discrète et continue au sein de cet échantillon, et 3Dflex, qui permet d'en explorer l'hétérogénéité continue (Punjani et al., 2021, Pujani et al., 2023a). Etant donné que la micelle est plus

facilement visualisée dans les reconstructions de VSV G entière à pH acide qu'à pH neutre, seule l'analyse réalisée sur la conformation de VSV G à pH acide est présentée ici. D'autre part, un travail important de l'étude de cette micelle à l'aide de masques à également été réalisé mais n'est pas présenté ici.



**Figure 38. Flexibilité des domaines CTD, TMD et ICD de VSV G**

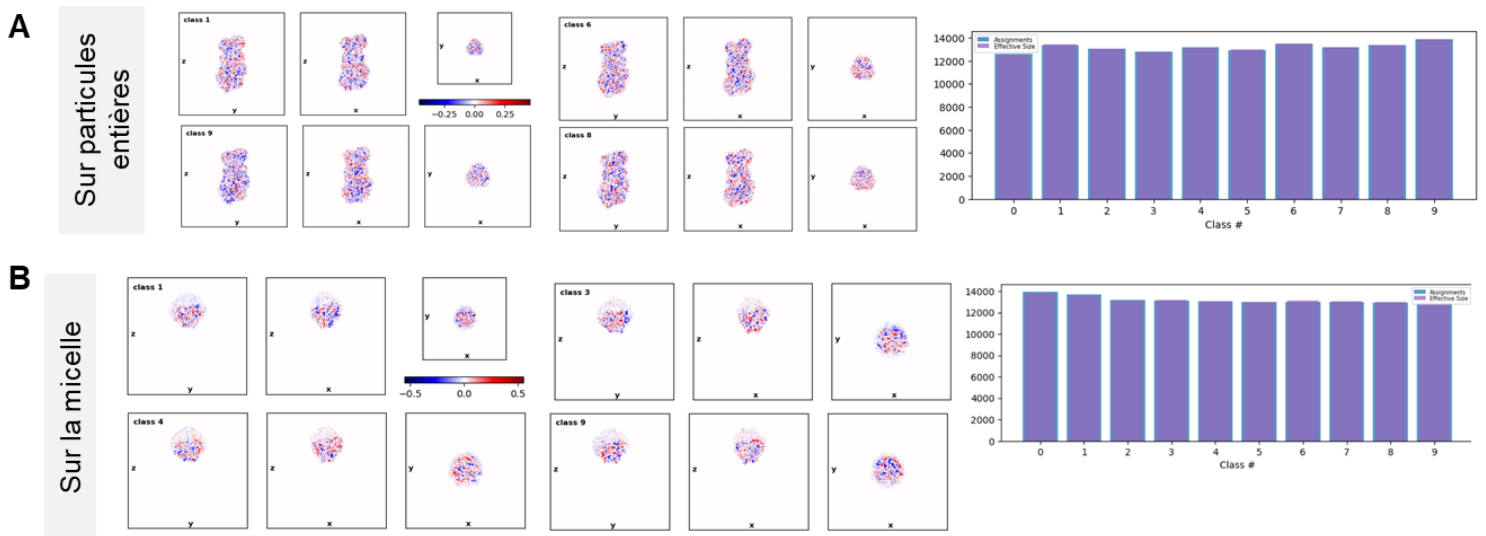
(A) Aucune densité identifiable n'est visible au sein des micelles de VSV G à pH acide (gauche) et pH neutre (droite). (B) Organisations possibles de l'ancrage transmembranaire de VSV G à pH acide (gauche) et pH neutre (droite). (C) Le TMD de HA du virus Influenza est organisé en hélice  $\alpha$  qui se croisent au sein de la micelle dans sa conformation pré-fusion. La flexibilité de la région reliant les TMDs à l'ectodomaine de HA permet des orientations différentes entre le TMD et l'ectodomaine de HA ( $52^\circ$  - gauche - ou  $0^\circ$  - droite). (D) Les conformations adoptées par la MPER, le TMD et le domaine intraviral de VSV G peuvent être discrètes (gauche) ou continues (droite).

#### a. Hétérogénéité discrète

La classification 3D est un outil implémenté dans cryoSPARC qui permet d'identifier des états hétérogènes discrets d'une même protéine au sein d'un échantillon. Cet algorithme a la particularité de réaliser une classification 3D sans alignement préalable des particules (i.e. réaligments des orientations ou déplacements des particules) grâce à un modèle linéaire de maximisation. Ce



traitement permet d'identifier différentes conformations (classes) qu'une même protéine peut adopter en cas d'hétérogénéité discrète. Dans notre cas, aucune classe n'a fait ressortir de densité clairement identifiable au niveau de la micelle (**Figure 39**). Le domaine TMD de VSV G ne semble donc pas adopter plusieurs conformations discrètes au sein de la micelle de détergent, mais plutôt, un continuum de conformations.



**Figure 39. Exemple de classes 3D présentant l'organisation de la micelle de VSV G à pH acide**  
**(A)** Exemples représentatifs de classes 3D générées par l'outil de classification 3D sur VSV G entière. Aucun mouvement au sein de la micelle n'est clairement identifié. **(B)** Exemples représentatifs de classes 3D générées par l'outil de classification 3D sur la micelle de VSV G. De même que précédemment, aucune densité ne ressort clairement au niveau de la micelle.

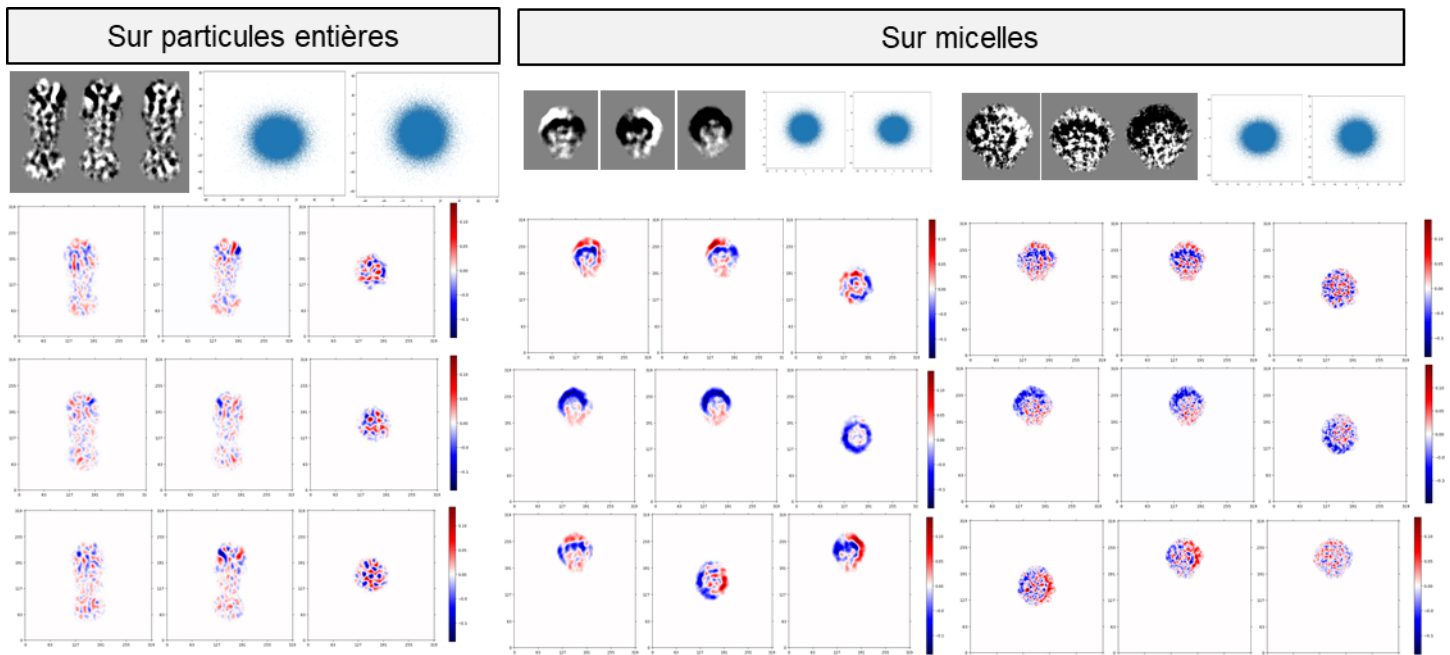
### b. Hétérogénéité continue

Deux outils, disponibles dans cryoSPARC, ont été utilisés pour mener à bien cette étude : 3DVA et 3DFLEX (Pujani et al., 2021, Pujani et al., 2023).

#### 3DVA

3DVA, pour *3D variability analysis*, est un modèle linéaire dans lequel les images de particules individuelles ne sont pas utilisées pour définir des clusters séparés, mais une famille continue de conformations 3D (Pujani et al., 2021). Cette famille est décrite par une moyenne dans l'espace des conformations de la protéine étudiée et par des composants de variabilité (Pujani et al., 2021). 3DVA permet d'une part une interprétation visuelle de l'espace conformationnel de l'objet, et d'autre part, de déterminer la/les directions et l'amplitude de la flexibilité continue de l'objet.

Un cycle d'analyse de 3DVA ciblée sur la micelle a ainsi été réalisé (**Figure 40**). Lorsque l'analyse 3DVA est réalisée sur VSV G entière, aucun mouvement précis au sein de la micelle n'est vraiment identifié (**Figure 40.A**). Lorsque l'analyse 3DVA est réalisée sur la micelle isolée (par l'utilisation de masques) à faible résolution, des mouvements dans deux directions sont identifiés (**Figure 40.B**). Néanmoins, la résolution des reconstructions n'est pas suffisante pour pouvoir pousser l'analyse plus loin (**Figure 40.C**).



**Figure 40. Résultats de l'analyse 3DVA effectuée sur VSV G à pH acide**

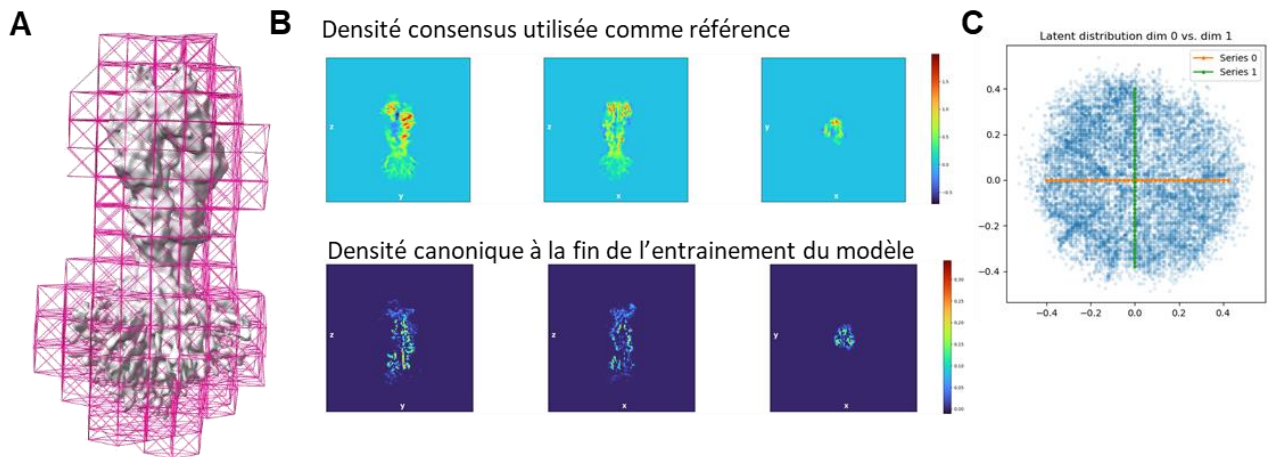
Analyse 3DVA représentative réalisée sur VSV G entière (gauche), sur la micelle isolée de VSV G à faible résolution (milieu) et à haute résolution (droite).

## b. 3DFLEX

3DFlex est un réseau neuronal capable de cartographier l'hétérogénéité continue observée dans les images de cryo-EM de protéines dans des conformations et des orientations variées (Pujani et al., 2023). Ce réseau neuronal génère un champs de déformabilité de la protéine étudiée pour chaque coordonnée présente dans la carte de densité par rapport à une carte 3D de densité de haute résolution (Pujina et al., 2023). 3DFLEX génère ensuite un champs de déformation global, à l'échelle de la protéine, qui modifie ou « *bend* » la densité 3D de la protéine, permettant ainsi de visualiser les changements de conformation continus de la protéine, et donc sa flexibilité (Pujina et al., 2023).

Pour se faire, 3DFLEX repose sur la génération d'une maille tétraédrique à partir d'un volume généré en amont du traitement, qui permet de quantifier la déformation et le type de mouvements de la protéine (Pujina et al., 2023) (

**Figure 41.A).** Néanmoins, dans notre cas, aucun axe de flexibilité ne se dégage réellement des données (



**Figure 41),** ce qui ne permet pas de pousser plus loin l'analyse.

**Figure 41. Exemple de résultats de l'analyse 3DFLEX effectuée sur VSV G à pH acide**

**(A)** Exemple de maille générée pour l'analyse de la flexibilité de la micelle par rapport à l'ectodomaine de VSV G. **(B)** Densités générées lors de la phase d'apprentissage du modèle 3DFLEX. **(C)** Espace des conformations adoptées par VSV G. Aucun axe de flexibilité ne se dégage de l'analyse.

### III. Conclusion et perspectives

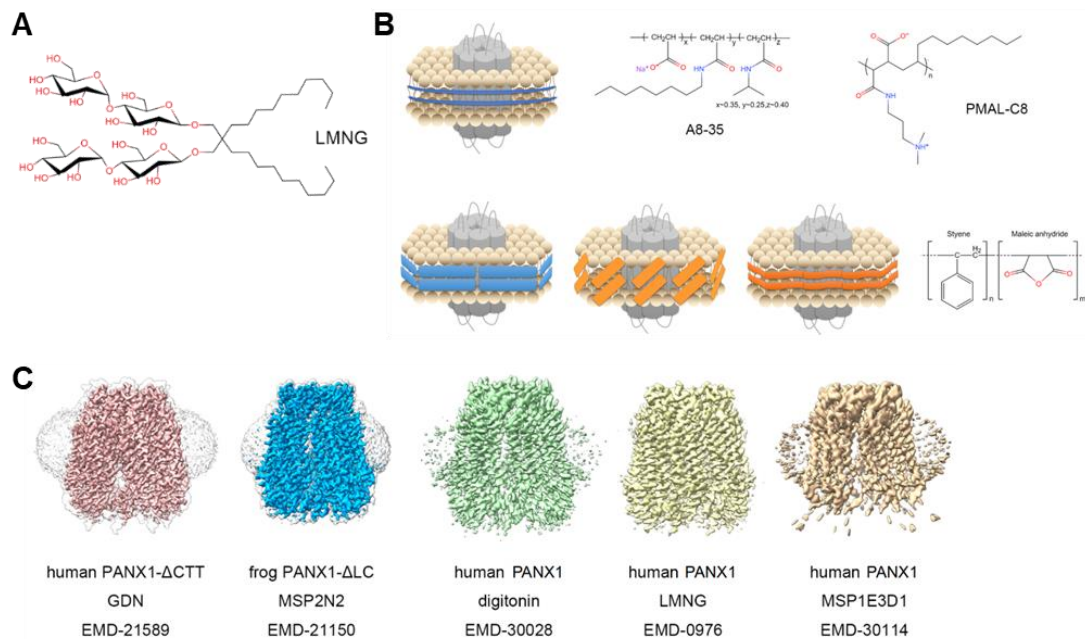
#### Choix du système d'étude

Malgré les analyses de la flexibilité de la micelle de VSV G entière, aucune densité de qualité suffisante n'a pu être extraite pour permettre une meilleure compréhension de l'organisation du CTD, du TMD et du domaine intraviral de VSV G, à la fois dans sa conformation post-fusion que pré-fusion (résultats non montrés ici). Cela indique un degré de flexibilité de ces régions au sein de la micelle de détergent.

Nous avons ici fait le choix d'étudier VSV G entière dans une micelle de détergent LMNG (Lauryl Maltose Glucopyranose Neopentyl Glycol) (**Figure 42**). Il s'agit d'un détergent amphiphile composé par deux chaînes hydrophobes de longueur égale, liées au niveau d'un carbone asymétrique, portant chacune un groupe maltoside hydrophile (Chae et al., 2010). Cette organisation permet au LMNG de mieux imiter l'environnement lipidique, et donc de mieux stabiliser les protéines membranaires à la différence de nombreux autres détergents commerciaux. D'autre part, le carbone asymétrique central a été ajouté pour induire « des contraintes subtiles sur la flexibilité des protéines solubilisées » (Chae et al., 2010). Il a effectivement été constaté que le LMNG améliore de manière significative la stabilité des protéines membranaires extraites avec ce détergent tout en maintenant leur structure et leur fonction, qu'il facilite la résolution de nombreuses structures protéiques par cryo-EM (Breyton et al., 2010, Hauer et al., 2015, Huynh et al., 2016, Dang et al., 2017) et qu'il est devenu le détergent de référence pour l'étude des glycoprotéines virales (Benton et al., 2018, Zhang et al., 2022, Katz et al., 2022, Rayaprolu et al., 2023). Néanmoins, il n'est pas exclu que la flexibilité observée chez VSV G entière soit en partie liée à ce système d'étude.

D'autres systèmes auraient pu être choisis, notamment l'utilisation de nanodisques. Les nanodisques sont des molécules protéolipidiques autoassemblées, composées de phospholipides choisis et d'une ceinture stabilisatrice constituée ou bien de MSP (*membrane scaffold protein*) ou bien de copolymères amphiphiles (SMA par exemple). Ces systèmes ont déjà été utilisés pour étudier des protéines virales membranaires avec succès (Nars et al., 2017, Dolan et al., 2017, Moon et al., 2022) et pourraient être une alternative au système détergent que nous avons utilisé ici. Néanmoins, compte-tenu de la flexibilité importante observée en présence de détergent dans notre système de particules isolées, il est peu probable que ce l'utilisation de nanodisques permettent de résoudre ce problème de flexibilité.

Une approche par cristallographie peut également être envisagée. Plusieurs essais ont déjà eu lieu précédemment, sans succès. La structure complète de la glycoprotéine gB de HSV-1 a été résolue par cristallisation (Cooper et al., 2018) en stabilisant notamment la région membranaire par des amphipiles (**Figure 42**), ce qui a permis d'obtenir des cristaux diffractants (Cooper et al., 2018). Une approche similaire pourrait être aussi envisagée avec VSV G.



### Figure 42. Systèmes mimétiques de la membrane lipidique

Extrait de Li et al., 2021. **(A)** Organisation du détergent LMNG (Lauryl Maltose Glucopyranose Neopentyl Glycol) utilisé dans cette étude. **(B)** Schéma des différents systèmes mimétiques de membranes lipidiques actuellement disponibles : en haut, les amphipiles les plus courantes A8-35 et PMAL-C8 sont représentées (sous-unités à droite) ; en bas, de gauche à droite, des nanodisques MSP, le système saponine-lipoprotéine et des nanodisques SMA (copolymère amphiphiles). L'unité structurale du SMA est présentée. **(C)** Exemple de la structure de PANX1 résolue dans ces différents systèmes mimétiques de la membrane.

Enfin, il serait possible de stabiliser les domaines CTD, TMD et intraviral à l'aide de *binders* dirigés contre ces régions. Pour cela, nous avons initié une collaboration avec l'équipe de Philippe Minard et Agathe Urvoas, I2BC, qui ont développé une banque d' $\alpha$ Reps (Urvoas et al. 2010, Urvoas et al. 2012, Valerio-Lepiniec et al. 2015). Ces binders artificiels sont présentés en **Partie II.V**. La sélection de ces binders étant en cours, ce projet ne sera pas plus développé ici.

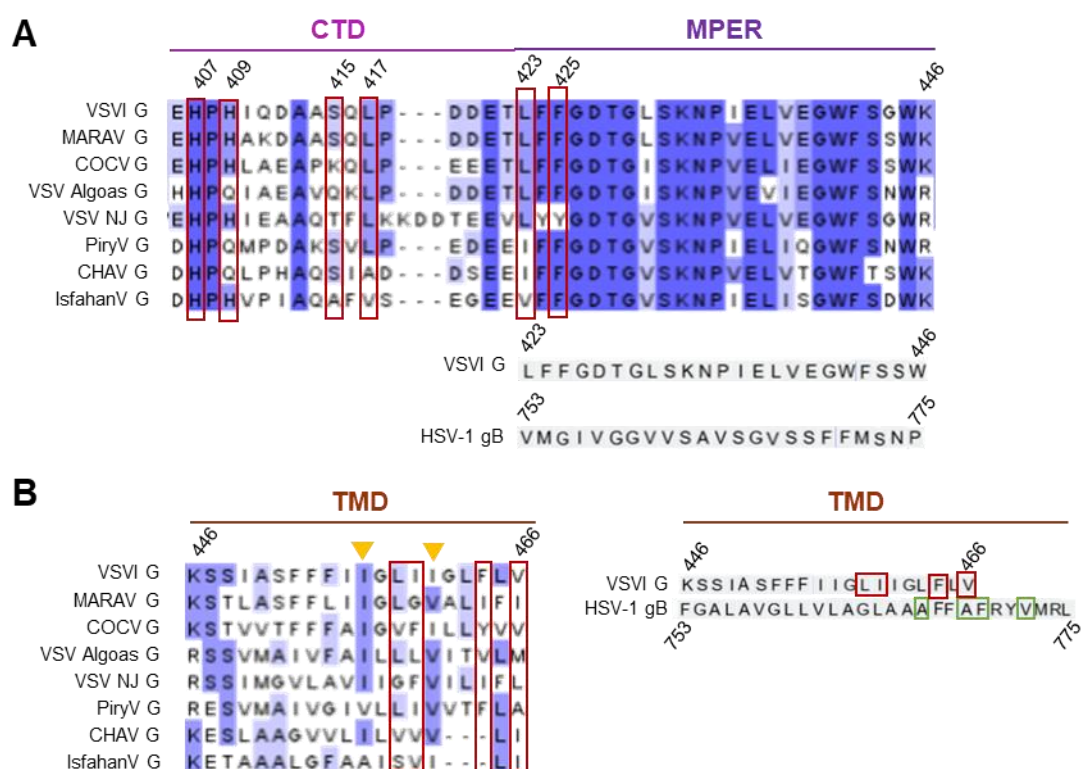
## Mécanisme de fusion de VSV G

### Réorganisation du segment C-ter au cours de la transition structurale

La résolution de la structure post-fusion de VSV G jusqu'au résidu 426 a permis d'identifier un patch hydrophobe constitué par les résidus L423 et F425, portés par le CTD, le résidu I82 porté par le domaine FD du protomère dont découle le CTD et les résidus L105 et P107 portés par le protomère voisin (**Figure 2.article**). Ce patch hydrophobe est également présent dans la conformation pré-fusion de VSV G (**Figure 2.article**) (Belstein et al., 2020). Dans les deux cas, ce motif semble stabiliser le CTD au contact du FD, mais selon une organisation complètement différente (**Figure 2.article**). Il serait intéressant de valider le rôle joué par les résidus L423 et F425, individuellement et/ou simultanément par des expériences de mutagenèse couplées à des tests de fusion cellule-cellule, d'autant plus qu'il s'agit de résidus très conservés au sein des Vésiculovirus (**Figure 2.article, Figure 43**). Les mutations envisagées sont les suivantes : L423S/P et F425A/S. De façon intéressante, le motif <sup>424</sup>FFGDTG<sup>429</sup> a déjà été identifié comme important pour la fusion médiée par G (Jeentendra et al., 2002,2003). En effet, la délétion du segment <sup>424</sup>F-N<sup>433</sup> induit une abolition complète des propriétés de fusion de VSV G (Jeentendra et al., 2003). En parallèle, il est également pertinent de confirmer le rôle du résidu I82 dans la stabilisation du CTD, aussi bien dans la conformation pré- et post-fusion de VSV G (I82S par exemple) ainsi que les résidus L105 et P107 qui permettent de stabiliser ce segment CTD au contact des deux protomères voisins au sein du trimère post-fusion de VSV G. Si, au cours de l'étude de l'importance de ces résidus par mutagenèse couplée à des test fusion cellule-cellule, des mutations affectant la fusion sont identifiées, il serait intéressant d'identifier des mutations compensatrices par une approche de génétique inverse, comme déjà réalisé précédemment (Ferlin et al., 2014, Beilstein et al., 2020).

Au-delà du résidu 426, aucune densité n'est clairement identifiable dans les reconstructions SPA de cryo-EM (**voir II**), ce qui indique une flexibilité importante du segment CTD de G, en particulier de la région MPER (résidus 432-446), dans les deux conformations pré- et post-fusion. La capacité de flexibilité de ce segment est un facteur important dans le cadre du changement de conformation de VSV G, car c'est elle qui confère une plus grande liberté d'orientation et de réarrangement à l'ectodomaine (Beilstein et al., 2020, Jeentendra et al., 2002,2003). Il a notamment été montré que l'espacement entre l'ectodomaine de G et son ancre transmembranaire est important : la délétion des 9 (<sup>437</sup>L-W<sup>445</sup>) ou 13 résidus (<sup>433</sup>N-W<sup>445</sup>) terminaux de la MPER provoque l'abolition totale de l'activité de fusion de G (Jeentendra et al., 2003). Etant donné que le résidu 426 se situe proche des résidus modulant l'insertion des boucles de fusion dans la membrane (D121, T66, D247) dans la conformation

post-fusion de VSV G (**Figure 44.A**), et que fin du CTD (soit la MPER) comprend encore une vingtaine d'acides aminés avant le TMD, ce segment ne peut probablement pas directement plongé dans la micelle de détergent. En fait, il est probable que la MPER (résidus 430-446) soit localisée à l'interface entre les têtes polaires et les queues hydrophobes des lipides, comme ce qui a été décrit chez gB de HSV-1, une autre glycoprotéine de classe III (Cooper et al., 2018). Les structures prédites avec le logiciel AlphaFold2 pour cette région MPER sont toutes organisées en hélice  $\alpha$  (à noter que l'indice de confiance des modèles est très faible – pLDDT <50) (**Figure 44.B**). Enfin, cette région 427-446 est très conservée au sein des séquences de G de Vésiculovirus (**Figure 44.A**). L'organisation de ce segment est donc très probablement conservée au sein du genre.



**Figure 43. Alignement de séquence des segments CTD/MPER et TMD au sein du genre Vésiculovirus et entre les glycoprotéines de classe III**

**(A)** Alignement de séquence de la région 406-446 au sein du genre Vésiculovirus, comprenant la fin du segment C-ter (CTD, résidus 406-422) et la MPER (423-446) (haut). Les résidus identifiés comme jouant un rôle dans le réarrangement de cette région au cours de la transition structurale de G sont identifiés et encadrés en rouge (Beilstein et al., 2020, cette étude). La comparaison de la MPER entre VSV (sérotype Indiana) et gB de HSV-1 est présentée en bas à droite. **(B)** Alignement de séquence du domaine transmembranaire (TMD, résidus 446-466) au sein du genre Vésiculovirus (gauche) et entre VSVI et gB de HSV-1 (droite). A gauche, les résidus identifiés sur VSVI G comme ayant un impact sur le processus de fusion, sans que le mécanisme ne soit identifié, sont encadrés en rouge (Ci et al., 2018). Les deux glycines présentes dans le TMD de VSVI sont indiquées par une flèche jaune (Cleverly et al., 1998). A gauche, les résidus impliqués dans l'interface de trimérisation du TMD de gB de HSV-1 à pH neutre sont encadrés en vert.

Enfin, le rôle de ce verrou potentiel identifié au niveau du CTD doit être repositionné dans le processus de changement de conformation de VSV G (**Figure 45**). Les études précédentes ont montré que la transition structurale sur G est initiée par le déplacement du CTD qui quitte le sillon qu'il occupe dans la conformation pré-fusion avant tout autre réarrangement structural (Baquero et al., 2017, Beilstein et al., 2020). En particulier, la protonation des histidines H407 et H409, situées sur le segment CTD, pourrait créer une force répulsive qui permettrait d'initier le changement de conformation sur G (Beilstein et al., 2020) (**Figure 27, Figure 45**). Nous proposons ici que le repositionnement du segment CTD le long du domaine FD, ainsi stabilisé par l'interaction du patch hydrophobe défini par L423 et F425 du CTD avec I82 du protomère parent et L105 et P107 du protomère voisin, achève la transition structurale de VSV G.

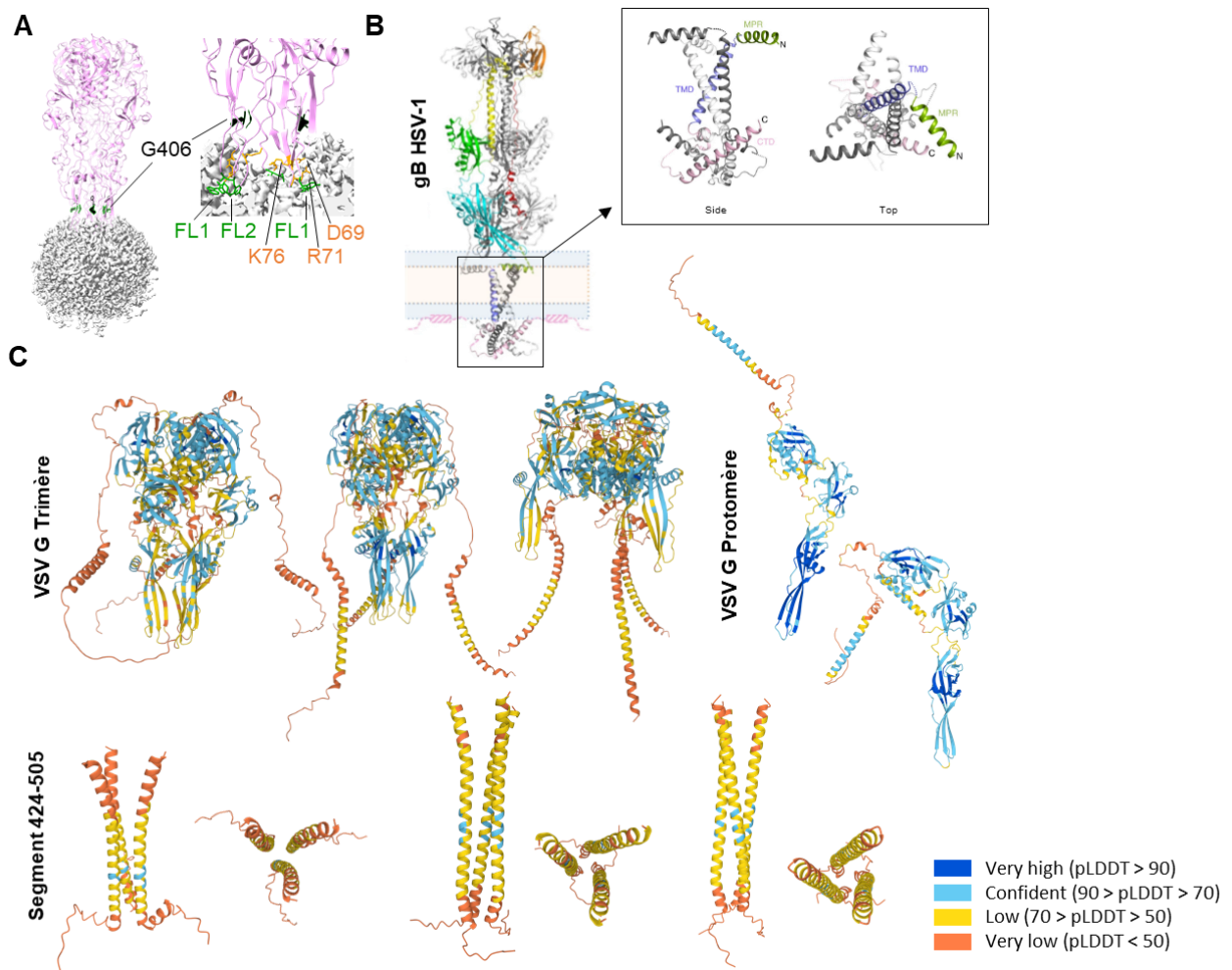
#### Flexibilité du domaine transmembranaire de VSV G

Aucune densité qui pourrait correspondre au TMD de VSV G n'est clairement observée dans les reconstructions par cryo-EM, ce qui témoigne de nouveau de la flexibilité de ce segment au sein de la micelle de détergent. Cette flexibilité avait déjà été suggérée comme importante chez VSV G, notamment du fait de la présence de glycines qui agiraient comme des briseurs d'hélice au sein du TMD (Cleverly et al., 1998) (**Figure 30**).

Il est admis chez les glycoprotéines de classe I que l'interaction entre les TMDs est requise pour le processus de fusion (Benton et al., 2018, Miyauchi et al., 2010, Victor et al., 2012, Chen et al., 2017). Cette propriété a également été observée sur la structure complète de gB de HSV-1 (Cooper et al., 2018). Dans la structure résolue, les trois TMDs de gB sont organisés en tipi inversé (**Figure 44.B**) et sont stabilisés par un motif *knob-and-hole* qui fait notamment intervenir les résidus A791, A794, F795 et V798 (Cooper et al., 2018). La comparaison des séquences des TMDs de VSV G et gB de HSV-1 ne permet pas d'identifier des résidus équivalents dans le TMD de VSV G (**Figure 43.B**). L'absence de densité clairement identifiable au sein de la micelle de détergent laisse penser que les domaines transmembranaires, probablement repliés en hélice, n'interagiraient pas entre eux au sein des trimères pré- et post-fusion. Cette observation explique également en partie les difficultés à cristalliser VSV G entière malgré de nombreux essais, la protéine présenterait une flexibilité trop importante au niveau de la zone membranaire.

Si les prédictions AlphaFold2 (Jumper et al., 2021) de la structure complète de VSV G modélisent bien individuellement le domaine TMD par une hélice  $\alpha$  légèrement courbée, ces prédictions restent peu fiables ( $70 > \text{pLDDT} > 50$ ) (**Figure 44.C**).

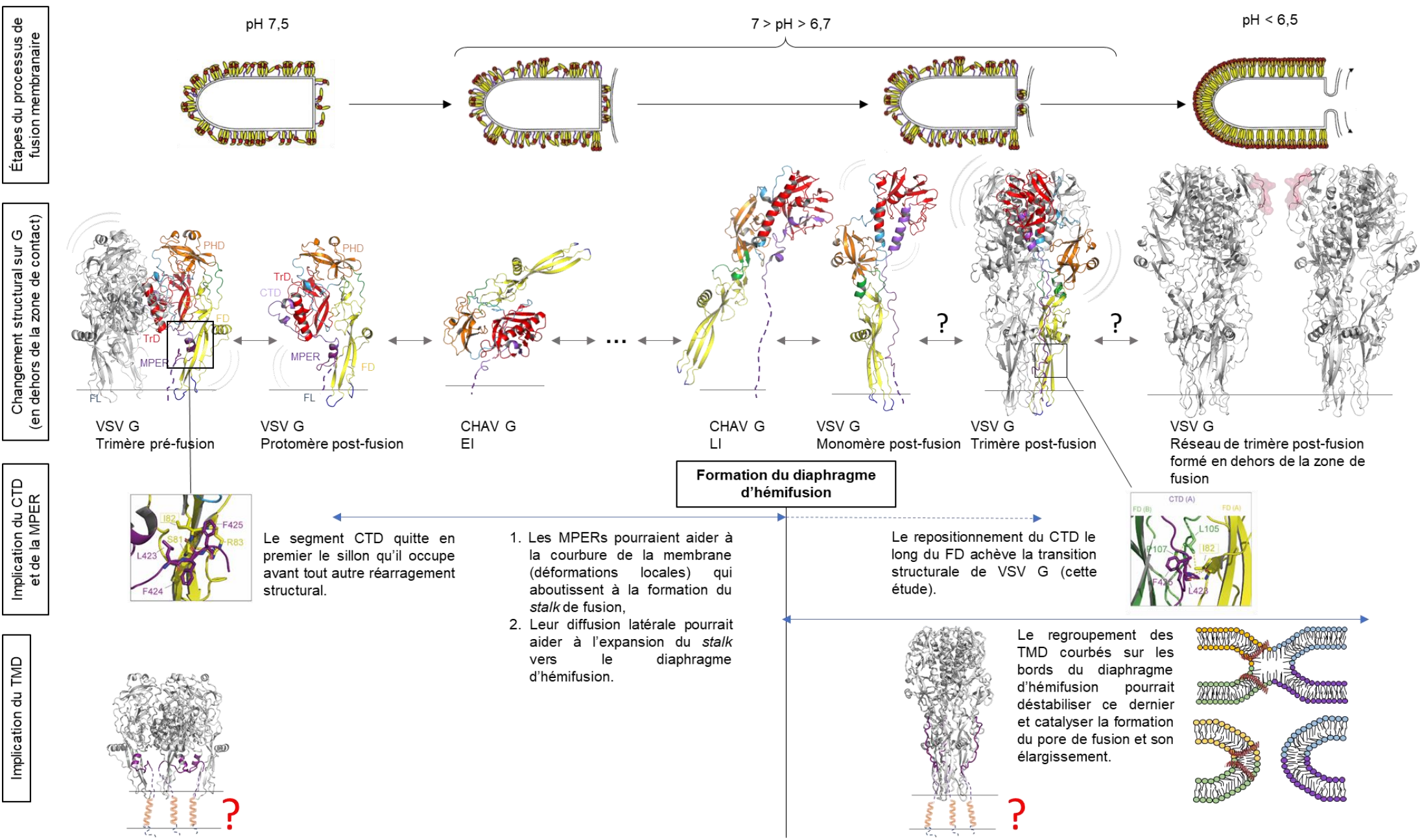




**Figure 44. Prédiction de la structure de VSV G par AlphaFold2**

(A) Localisation du résidu 426 sur le trimère post-fusion de VSV G. (B) Organisation en piédestal de la MPER et en tipi du domaine TMD de de gB de HSV-1. (Cooper et al., 2018) (C) Modélisations du trimère et du protomère de VSV G entière et du segment MPER-TMD-ICD par AlphaFold2.

Le processus de fusion mettant en jeu les résidus identifiés présentés en **Table 1** qui se dégage des données biologiques et structurales actuellement disponibles est présenté en **Figure 45**. Compte-tenu des artefacts liés au système d'étude choisi, il serait aussi intéressant de confirmer le processus de fusion présenté ci-dessous (**Figure 45, Table 1**) par une approche de dynamique moléculaire (MD), comme cela a déjà été présenté pour le processus de fusion médié par HA du virus Influenza par exemple (Zhou et al., 2014, Lin et al., 2018, Victor et al., 2015, Pabis et al., 2020). Notamment, le processus complet de fusion médié par HA a été étudié en modélisant l'interaction d'une bicouche lipidique plane avec un protéoliposome décoré par des HA entières activées par l'abaissement du pH (Pabis et al., 2018). Cette simulation pourrait notamment permettre de compléter les données biologiques disponibles sur le rôle joué par la MPER et le domaine transmembranaire de G dans le processus de fusion.



**Figure 45. Modèle du processus de fusion membranaire médié par la G des Vésiculobirus**

*Adapté de Abou-Hamdan et al., 2015, Beilsetin et al., 2020.*



**Table 1. Récapitulatif des résidus impliqués dans le processus de fusion membranaire médié par VSV G.** Adapté de Roche et al., 2008

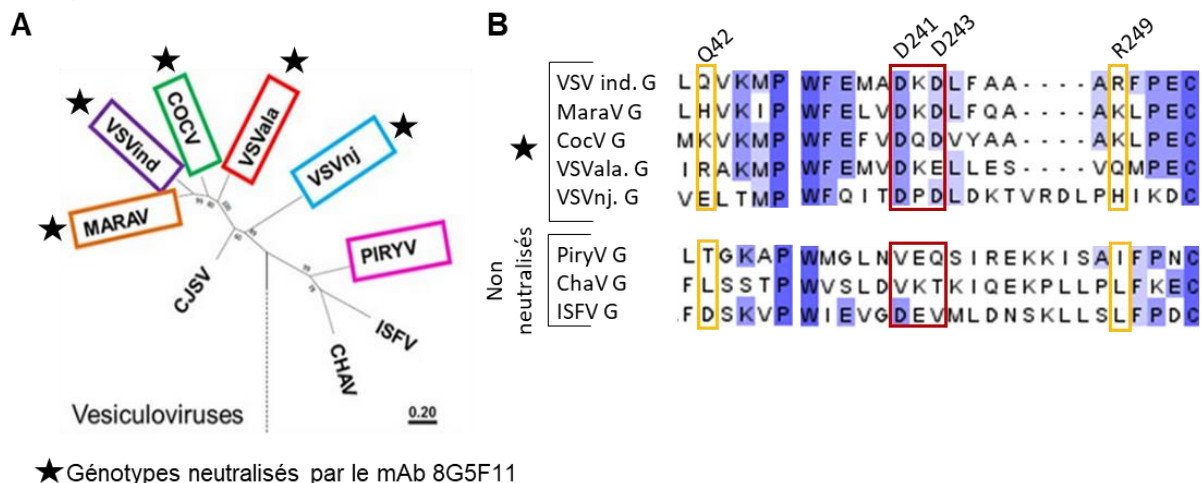
Mutations	Phénotype observé	Implication du résidu/du motif dans le processus de fusion	Référence
<b>I. Boucles de fusion</b>			
VSV G W72V/A VSV G Y73V/A VSV G Y116V/A VSV G A117R/H/K	Abolition totale de l'activité de fusion de VSV G.	Il s'agit des résidus hydrophobes constitutifs des boucles de fusion de G. Les résidus hydrophobes ont été remplacés par un résidu chargé, les résidus aromatiques par un résidu aliphatique, moins enclins à déstabiliser l'interface entre les chaînes des acides gras et la tête hydrophile des lipides.	Sun et al., 2008
<b>II. Résidus du domaine TMD</b>			
VSV G 457/G461 A/A VSV G 457/G461 L/L (VSV G457A) (VSV G461A) VSV G 474L <sup>475</sup> S/S 483RV <sup>484</sup> A/A VSV G 474L <sup>475</sup> S/S 479F A VSV G 483RV <sup>484</sup> A/A 479F A	Abolition totale de l'activité de fusion de VSV G. Activité de fusion réduite mais maintenue. Atténuation de l'activité de fusion cellule-cellule et de l'infection virale.	Au moins 1 glycine est indispensable à la dernière étape du processus de fusion médié par VSV G. Elle stabilise probablement un diaphragme d'hémifusion quasi-stable. En dehors des glycines, ces résidus sont, ensembles, essentiels à l'activité de fusion de VSV G.	Cleverly et al. 1998 Ci et al., 2018
<b>III. Résidus du segment CTD et de la MPER</b>			
L423, F425	Aucune observation pour le moment	Avec les résidus I82, L105 et P107 du FD, ce patch hydrophobe stabiliserait le CTD dans la conformation pré- et post-fusion de VSV G. La MPER participe à l'activité de fusion médiée par G, sans que les résidus aromatiques de ce segment soient indispensables (à la différence de ce qui a été montré chez GP41 de HIV-1, Salzwedel et al., 1999).	<b>Cette étude</b>
VSV G Δ <sup>424</sup> FFGDTG <sup>429</sup> VSV G Δ <sup>437</sup> L-W <sup>445</sup>	Abolition totale de l'activité de fusion de VSV G.		Jeetendra et al., 2003
<b>IV. Intermédiaire dimérique de fusion</b>			
VSV G D137L VSV G D137N VSV G H80A/E VSV G H80K VSV G D121E/123 L/L VSV G Q112P	Atténuation de l'activité de fusion de VSV G, et détectée seulement en dessous de pH5,5. Abolition totale de l'activité de fusion de VSV G et mutation compensatoire H80K Abolition totale de l'activité de fusion de VSV G et mutation compensatoire Q112P	Résidus impliqués dans la formation de l'intermédiaire de fusion tétramérique entre les états EI et LI de VSV G.	Baquero et al., 2017
VSV G E139L VSV G E76K	Atténuation de l'activité de fusion et mutation compensatoire E76K		Fredericksen et Whitt, 1995
<b>V. Interrupteurs permettant la transition de la forme pré-fusion vers la forme post-fusion de VSV G</b>			
VSV G H407A VSV G L396I	Abolition totale de l'activité de fusion de VSV G et mutation compensatoire L396I.	Interrupteurs sensibles au pH permettant la transition induite par abaissement du pH : H407A déstabilise du trimère pré-fusion de VSV G.	Beilstein et al., 2020
VSV G H389A VSV G D280L	Atténuation de l'activité de fusion de VSV G, et détectée seulement en dessous de pH5,5		
VSV G F2L	Stabilisation de la conformation pré-fusion de VSV G.	F2 établi des liaisons de Van der Waals avec les résidus I387 et M391 de l'hélice 383-399 formée par le segment C-ter dans la structure post-fusion de VSV G.	Martinez et al., 2005
RABV G M44V/I <-> VSV G Q42	Transition de la forme pré- vers la forme post-fusion de VSV G ralentie.	Résidus localisés dans la région charnière entre le PHD et le FD de G.	Gaudin et al., 1996
RABV G E282K <-> VSV G L283 VSV Q285R	Stabilisation de la conformation pré-fusion de VSV G.	Résidus localisés dans l'hélice central de du TrD de G. Leur mutation affecte probablement l'interface trimérique de G dans une ou les deux conformations pré- et post-fusion.	Martinez et al., 2005 Gaudin et al., 1996
RABV G V392G <-> VSV G A402 RABV G M396T <-> VSV G E406	Stabilisation de la conformation pré-fusion de VSV G.	Résidus localisés dans la région charnière entre le TrD et le domaine C-terminal de G	Gaudin et al., 1996
<b>VI. Interrupteurs permettant la transition de la forme post-fusion vers la forme pré-fusion de VSV G</b>			
VSV G D268L VSV G D268N	<ul style="list-style-type: none"> <li>Augmentation de l'hélicité de la région 264-273 permettant la stabilisation la conformation post-fusion de VSV G.</li> </ul>		
VSV G L271P	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mutation compensatoire de D268L qui diminue de l'hélicité de la région 264-273 permettant la stabilisation de la conformation pré-fusion de VSV G.</li> </ul>	Interrupteurs permettant la transition induite par l'élévation du pH : D268L stabilise le trimère post-fusion de VSV G, tandis que L271P stabilise le trimère pré-fusion de VSV G.	Ferlin et al., 2014
D274N D395N D393N	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminution de l'activité de fusion cellule-cellule médiée par G (contributions supplémentaires à D268)</li> </ul>		
VSV G108A/E VSV G109Y VSV P111D/G/L	Atténuation de l'activité de fusion de VSV G, et détectée seulement en dessous de pH5,5.	Ces résidus sont localisés dans l'hélice riche en prolines, elle-même localisée en amont de la deuxième boucle de fusion ( <sup>116</sup> YA <sup>117</sup> ). Cette hélice est impliquée dans les interactions latérales avec les protomères voisins dans la conformation post-fusion de G.	Zhang et al., 1994 Fredericksen et Whitt, 1995

## Antigénicité

### Caractère pan-neutralisant de 8G5F11

La résolution de la structure du complexe entre VSV G et l'anticorps neutralisant 8G5F11 a permis de poser les premières bases structurales de la neutralisation des Vésiculovirus. 8G5F11 reconnaît un épitope structural localisé principalement au niveau de l'hélice principale du PHD de VSV G. Cet épitope, compris dans la région 240-250, fait partie des régions les plus exposées de VSV G à la surface des particules virales lorsque G est dans sa conformation pré-fusion (**Figure 33**). La faible conservation de cette région, comparée au reste de G (**Figure S4**), indique que c'est bien la réponse humorale qui est le moteur de la diversification de l'architecture de la G des Vésiculovirus.

Munis et al., 2018, ont montré que 8G5F11 est capable de neutraliser plusieurs souches du genre Vésiculovirus (**Figure 46.A**) : les sérotypes du virus de la stomatite vésiculaire Indiana et le virus Maraba sont fortement neutralisés par 8G5F11 (IC50 respectifs de l'étude : 11,5 ng/mL et 100 ng/mL) (Munis et al., 2018). 8G5F11 peut également neutraliser à plus haute concentration les sérotypes New Jersey (NJ) et Algoas et le virus Cocal (IC50 : 13, 85 et 86 mg/mL respectivement) (Munis et al., 2018). L'étude rapporte également que le virus Piry, lui, n'est pas neutralisé par 8G5F11 (Munis et al., 2018). Pour information, nous avons mené l'étude de neutralisation sur le sérotype Indiana (VSV Indiana Mudd Summer, VSVI). Cette différence de neutralisation s'explique en partie par la conservation des résidus acides en position 241 et 243 au sein des génotypes neutralisés par 8G5F11 (VSVI, NJ, Algoas et virus Cocal) (**Figure 46.B**). Ces deux résidus acides ne sont pas retrouvés chez le virus Piry, ni chez les virus Chandipura et Isfahan, autres Vésiculovirus d'intérêt médical (**voir Introduction.I-B.1**) (**Figure 46.B**).



**Figure 46. Caractère pan-neutralisant de 8G5F11**

(A) Arbre phylogénétique des principaux génotypes au sein des Vésiculovirus. Les virus étudiés par Munis et al., 2018, sont encadrés. Ceux neutralisés par 8G5F11 sont accompagnés d'une étoile. (Adapté de Munis et al., 2018) (B) Comparaison de l'épitope reconnu par 8G5F11 chez les génotypes d'intérêt au sein des Vésiculovirus. Les résidus qui constituent l'épitope reconnu par 8G5F11 sur VSVI

(VSV ind., VSV Indiana) sont encadrés, en rouge pour les deux aspartates D241 et D243, indispensables, et en jaunes pour les résidus non indispensables à la reconnaissance par 8G5F11.

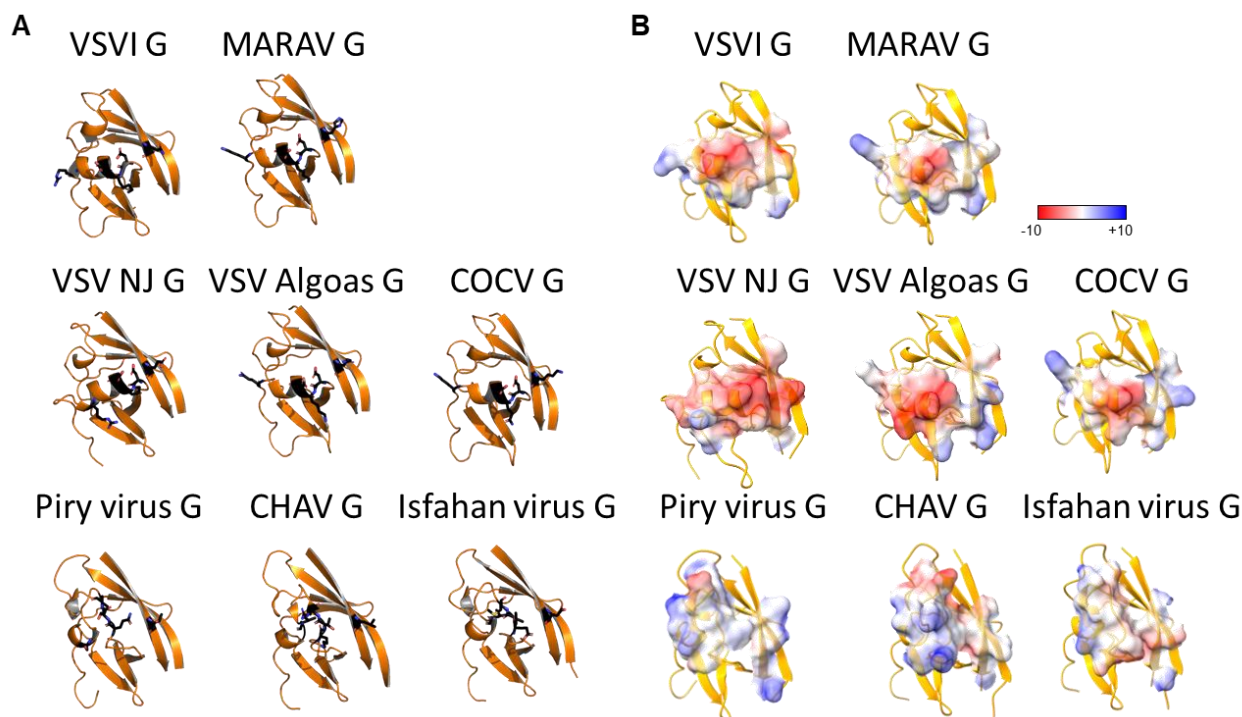
D'autre part, la modélisation par AlphaFold2 des domaines PHD des virus Piry et Isfahan prédit une organisation légèrement différente de la région 240-250 de G entre ces géotypes et VSVI, mais qui est similaire à celle de la structure résolue par cristallographie de G du virus Chandipura (CHAV G) (**Figure 47.A**). En particulier, cette région est repliée en hélice  $\alpha$  sur deux tours chez les virus neutralisés par 8G5F11, ce qui n'est pas le cas chez le virus Piry, ni chez les virus Chandipura et Isfahan (**Figure 46.A**). L'épitope identifié sur VSVI reconnu par 8G5F11 présente donc une architecture différente sur ces derniers virus. En particulier, le virus Isfahan (également d'intérêt médical) présente deux résidus acides en position 241 et 242 (**Figure 46.B**). Néanmoins, la comparaison des potentiels électrostatiques de la région 240-250 montre que, si cette région présente un potentiel électrostatique négatif chez les géotypes neutralisés par 8G5F11, ce n'est ni le cas chez le virus Isfahan, ni chez les virus Chandipura et Piry. Il est donc probable que 8GF511 ne soit pas capable de neutraliser les virus Chandipura et Isfahan, en plus du virus Piry.

Enfin, les structures 3D prédites ne permettent pas d'expliquer la différence d'efficacité de neutralisation des différents géotypes par 8G5F11 (VSVI et MARAV contre VSV NJ, Algoas et virus COCV) (**Table 2**).

**Table 2. Conservation de la structure du domaine PHD des Vésiculovirus**

La valeur RMSD et le nombre de carbones  $\alpha$  superposables sont indiqués pour chacun des Vésiculovirus indiqué et correspondent à la comparaison avec la structure de VSVI G (PDB : 5i2m). Les structures des domaines PHD de la G des virus Maraba, VSV NJ, Algoas, Cocal, Piry et Isfahan ont été modélisés par AlphaFold2. La structure du PHD de CHAV G est issue de la structure cristallographique du trimère post-fusion de CHAV G (PDB : 4d6w).

Domaine structural	Nombre de résidus	MaraV G / VSVI G (5i2m)	VSV NJ G / VSVI G (5i2m)	VSV Algoas G / VSVI G (5i2m)	COCV G / VSVI G (5i2m)	PiryV G / VSVI G (5i2m)	CHAV G / VSVI G (5i2m)	IsfahanV G / VSVI G (5i2m)
PHD	88 (36-46 et 181-259)	0,490 (80 C $\alpha$ )	1,483 (75 C $\alpha$ )	0,841 (85 C $\alpha$ )	0,745 (85 C $\alpha$ )	1,243 (59 C $\alpha$ )	1,384 (46 C $\alpha$ )	1,389 (43 C $\alpha$ )

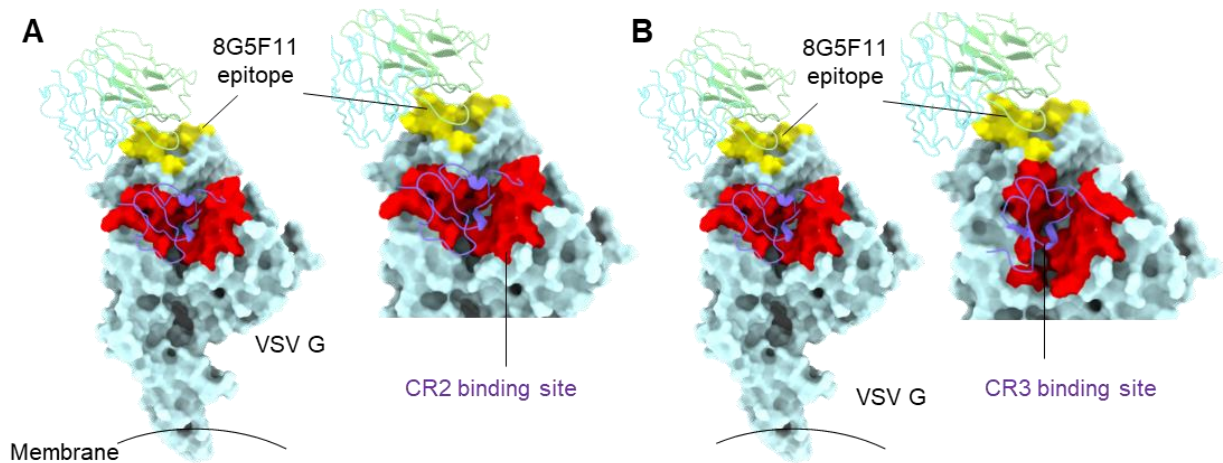


**Figure 47. Conservation de la structure 3D de l'épitope reconnu par 8G5F11 au sein de G des Vésiculovirus**

**(A)** Présentation de la structure du domaine PHD des différents génotypes étudiés. Les PHD des virus Maraba (Marav), VSV New Jersey (NJ), Cocal (COCV), VSV Algoas, Piry et Isfahan ont été modélisés par AlphaFold2 (Jumper et al., 2021). La structure du PHD de VSVI présentée est celle résolue par cryo-EM (cette étude) et celle du PHD de CHAV G par cristallographie (PDB : 4d6w). Les résidus constitutifs de l'épitope reconnu par 8G5F11 sont en noirs : Q42, D241, K242, D243 et R249. **(B)** Comparaison du potentiel électrostatique de l'épitope reconnu par 8G5F11 sur VSVI G et reporté sur les autres PHD.

### **Mécanisme de neutralisation de 8G5F11**

Munis et al., 2018 ont montré par SPR (résonance des plasmons de surface) que la liaison du mAb 8G5F11 sur G ne gêne pas la liaison de VSVI G au récepteur LDLR (Munis et al., 2018). Effectivement, lorsque les deux sites d'interaction (du LDLR et de 8G5F11) sont replacés sur la conformation pré-fusion de VSV G, force est de constater que ces deux épitopes ne se chevauchent pas (**Figure 48**). Il n'y a donc pas de compétition directe entre 8G5F11 et le LDLR pour la liaison à VSV G. Néanmoins, compte-tenu de la taille d'une IgG murine de classe 2a et de l'ectodomaine du LDLR, il est possible que la liaison de 8G5F11 à G limite l'interaction entre G à la surface des particules virales et le LDLR par de la gêne stérique.



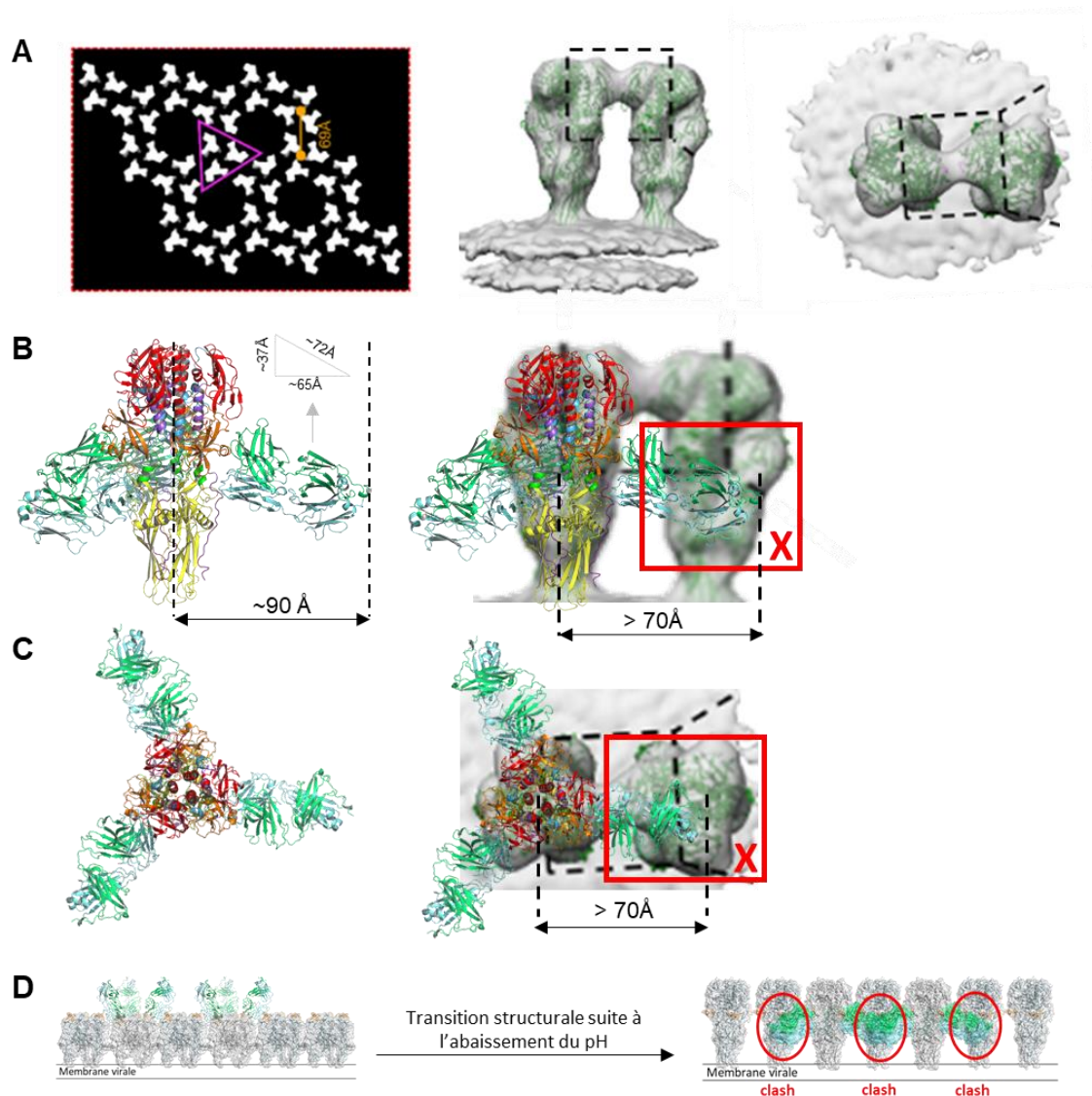
**Figure 48. Localisation de l'épitope reconnu par 8G5F11 et du site de reconnaissance du LDLR sur VSVI G**

**(A)** Comparaison de la localisation de l'épitope reconnu par 8G5F11 et le domaine CR-2 du LDLR (PDB : 5oyl). **(B)** Comparaison de la localisation de l'épitope reconnu par 8G5F11 et le domaine CR-3 du LDLR (PDB : 5oy9).

Ensuite, Munis et al., 2018 ont montré que la pré-incubation en présence de 8G5F11 de lentivirus pseudotypés avec VSVI G ne gêne pas l'internalisation des lentivirus (Munis et al., 2018). En revanche, dans leur système, aucune activité de transcription réverse n'est détectée suite à l'internalisation des lentivirus pseudotypés par VSVI G et préalablement incubés en présence de 8G5F11 (Munis et al., 2018). Ils proposent donc que 8G5F11 bloque l'étape de fusion membranaire qui survient après l'internalisation des particules virales (Munis et al., 2018).

La résolution de la structure du complexe VSVI G et du mAb 8G5F11 a montré que l'épitope reconnu par 8G5F11 est localisé au niveau du site antigénique A1 de VSV (Lefrançois et Lyles, 1982, Lefrançois et Lyles, 1983, Vanderpol et al., 1986) localisé sur le sommet de VSVI G dans sa conformation pré-fusion (**Figure 4.article**). La liaison de 8G5F11 à G ne bloque pas la transition structurale sur G suite à l'abaissement du pH en particules isolées, et le mAb reste lié au trimère dans sa conformation post-fusion, sans que cela ne gêne la transition structurale sur G (**Figure 4.article**). En revanche, il est probable que 8G5F11 bloque cette transition à la surface des particules virales du fait de la concentration plus importante de G et surtout la proximité des molécules de G entre elles à la surface des virions (**Figure 49.C**). En effet, la résolution de l'organisation de la particule virale de VSV par cryo-ET a notamment permis de décrire l'organisation supramoléculaire de G à pH acide (Zhou et al., 2022), c'est à dire le réseau hexagonal formé par G à la surface de VSV (**Figure 49.A**) (voir **Introduction II-C.2**). En particulier, Zhou et al., 2022, ont montré que les axes centraux de deux trimères pré-fusion de G sont espacés de 69 Å, et ceux de deux trimères post-fusion de G sont espacés de 67,9 Å à la surface des particules virales (**Figure 49.A**). Le repositionnement du trimère post-fusion de VSV G en complexe avec le FAb 8G5F11 dans les enveloppes de cryo-ET à pH acide montre qu'il est impossible que deux trimères post-fusion de VSV G en complexe avec 8G5F11 coexistent au sein du réseau hexagonal

observé à pH acide à la surface de VSV (**Figure 49.B&C**). Chaque FAb mesurant approximativement 65 Å de long, deux FAb portés par des protomères voisins de G, appartenant à deux trimères différents, empêcheraient le repliement de G vers sa conformation post-fusion (**Figure 49.B&C**). 8G5F11 empêcherait donc l'étape de fusion membranaire en créant une gêne stérique. Cet encombrement pourrait empêcher la transition structurale de l'état pré-fusion de G vers une conformation intermédiaires ou post-fusion. Il aussi possible que l'interaction avec 8G5F11 empêche la formation du réseau hélicoïdale de G post-fusion trimérique observé à la fin du processus de fusion membranaire et proposé comme nécessaire à la formation et l'élargissement du pore de fusion (**Figure 49.C, Figure 45**).



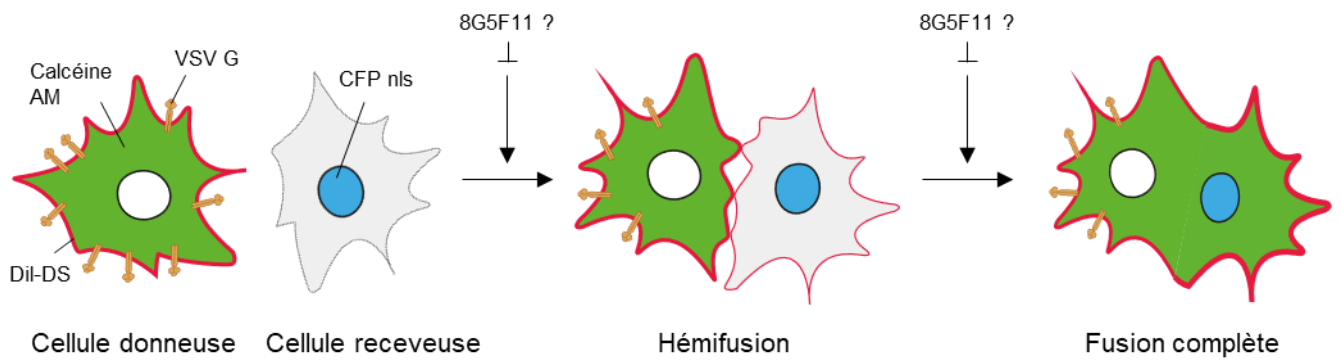
**Figure 49. Potentiel mécanisme de neutralisation de VSV par le mAb 8G5F11**

(A) Réseau et sub-tomogrammes moyens de deux trimères post-fusion de VSV G lorsque G forme un réseau hélicoïdale à la surface de la particule virale à pH acide, en vue du dessus (haut) et vue latérale (bas). (Extrait de Zhou et al., 2022) (B) Repositionnement du trimère post-fusion de VSV G en complexe avec le FAb 8G5F11 comme résolu dans les sub-tomogrammes précédents, en vue latérale. (C) Repositionnement de la structure du trimère post-fusion de VSV G en complexe avec le FAb 8G5F11 comme résolu dans les sub-tomogrammes précédents, en vue du dessus.



Plusieurs approches sont envisageables pour confirmer le mécanisme de neutralisation de VSV par 8G5F11. Il serait notamment pertinent d'observer directement l'interaction du FAb 8G5F11 lorsque G est ancrée à la surface de particules virales (pré-incubées en présence du FAb 8G5F11), à pH neutre et pH acide. Cela permettrait de confirmer ou d'infirmer que la liaison de 8G5F11 à VSV G gêne la transition structurale de G à pH acide dans un contexte infectieux et non plus en particules isolées. Dans ce cas, le réseau hexagonal formé par G à la fin du processus de fusion membranaire (Libersou et al., 2010) ne serait pas observable.

Il serait également intéressant compléter l'étude du mécanisme de neutralisation de VSV par 8G5F11 par des tests cellulaires. Après un rapide test pour confirmer que 8G5F11 ne bloque pas l'internalisation de VSV en contexte cellulaire, un test d'activité de fusion cellule-cellule peut être réalisé comme décrit dans Muñoz-Barroso et al., 1998 (repris par Jeentendra et al., 2002) et Ci et al., 2018 (**Figure 50**). Le test envisagé est basé sur la redistribution de marqueurs entre des cellules donneuses et des cellules receveuses au cours du processus de fusion membranaire. Comme proposé par Muñoz-Barroso et al., 1998, il s'agirait d'un test de fusion cellule-cellule à trois couleurs qui présente l'avantage de pouvoir étudier l'étape du processus de fusion sur laquelle la liaison de 8G5F11 à VSV G pourrait influencer (**Figure 50**). Dans ce test, les cellules présentant VSV G à leur surface sont doublement marquées par un marqueur cytoplasmique vert (calcéine AM) et un marqueur membranaire (Dil-DS) (Muñoz-Barroso et al. 1998) (**Figure 50**). Les cellules receveuses sont marquées au niveau de leur noyau par la protéine CFP présentant un signal de localisation nucléaire (Ci et al., 2018) (**Figure 50**). Au cours du processus de fusion membranaire, les cellules donneuses redistribuent dans un premier temps le marqueur lipidique : l'étape de formation du diaphragme d'hémifusion est caractérisée par le mélange des feuillettes externes des deux membranes impliquées dans la fusion (**Figure 16.A, Figure 50**). L'étape de formation et d'élargissement du pore de fusion, qui survient après la formation du diaphragme d'hémifusion, permet le transfert du marqueur cytoplasmique vert dans le cytoplasme des cellules receveuses (Muñoz-Barroso et al. 1998) (**Figure 50**). Si seul le marqueur lipidique est redistribué aux cellules receveuses, cela implique que 8G5F11 bloque le processus de fusion médié par G en amont de la formation et de l'élargissement du pore de fusion (**Figure 50**).



**Figure 50. Test de fusion tricolore proposé pour l'étude du mécanisme de neutralisation de VSVI par le mAb 8G5F11**

Pour conclure, cette étude de la neutralisation de VSV par 8G5F11 s'inscrit dans un contexte plus large. Comme mentionné dans la partie **Introduction.I-B.2**, VSVI G est actuellement considéré comme le *golden standard* des glycoprotéines utilisées pour pseudotyper de lentivirus dans le cadre de thérapies oncolytiques (voir **Introduction I-B.c**). Néanmoins, cette approche est limitée par l'importante réponse humorale préexistante à l'encontre de VSV G (Hangartner et al., 2006, Power et al., 2007). L'utilisation de G de Vésiculovirus différentes de celle de VSVI G, contre lesquelles la réponse humorale préexistante est plus faible voir n'existe pas, permettrait de contourner ce problème. En effet, Munis et al., 2019, montrent notamment que l'incorporation de COCV G ou MARAV G permet aux lentivirus pseudotypés par ces glycoprotéines de contourner l'immunité humorale préexistante contre VSVI G (Munis et al., 2019). A ce jour, très peu d'outils moléculaires sont disponibles pour caractériser ces glycoprotéines de Vésiculovirus. La résolution de la structure de VSVI G en complexe avec le mAb neutralisant 8G5F11 apporte ainsi des bases rationnelles pour le design de produits thérapeutiques.



## **Résultats II. Étude structurale de la glycoprotéine des Lyssavirus**

Dans cette deuxième partie, le travail sur l'étude des structures de glycoprotéines de Lyssavirus (LYSV G) est présenté. A la différence du chapitre précédent, ce travail reste largement exploratoire et est moins avancé. Après une courte contextualisation, le matériel et méthode propre à ce travail est présenté, puis les premiers résultats obtenus, et cette partie se conclut par les perspectives nombreuses de cette étude.

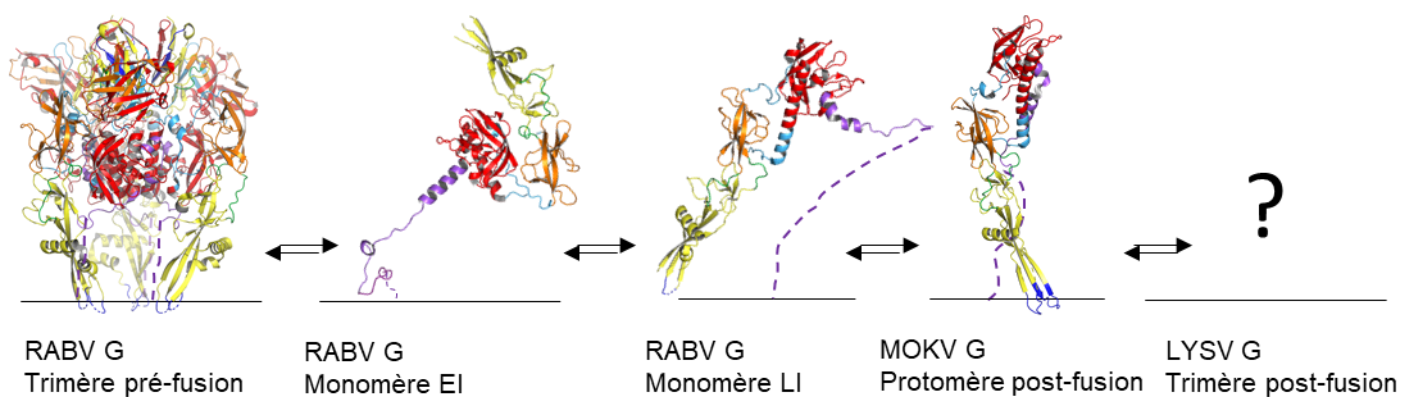
## I. Contexte du travail mené

En 2020, peu de données structurales sur les G de Lyssavirus (LYSV) étaient disponibles (**Figure 51**) : deux conformations intermédiaires monomériques de l'ectodomaine de RABV G avaient été déterminées par cristallographie aux rayons X (Yang et al., 2020), ainsi que la structure d'un monomère de l'ectodomaine de la glycoprotéine du virus Mokola (MOKV G) sous sa conformation post-fusion (phylogroupe II, Belot et al., 2020). Par la suite, la structure du trimère pré-fusion de RABV G a été résolue par cryo-EM (Ng et al., 2022, Callaway et al., 2022) (**Figure 51**). Si ces structures ont permis une nette amélioration de notre compréhension du paysage conformationnel des LYSV G, aucune structure trimérique de LYSV G sous leur conformation post-fusion ni de structure entière (i.e avec le domaine transmembranaire et le domaine intraviral) ne sont décrites à ce jour.

D'une part, seules les structures de RABV G et MOKV G sont connues à ce jour. Or les vaccins et immunoglobulines antirabiques actuellement disponibles ciblent principalement RABV G et confèrent une protection efficace contre les Lyssavirus du phylogroupe I (De Benedictis et al., 2016, Chao et al., 2017, Kim et al., 2021) mais pas contre les Lyssavirus des autres phylogroupes (Ertl HCJ, 2019, de Melo et al., 2022). La détermination de structures de LYSV G apporterait donc des informations nécessaires au développement de vaccins à large spectre.

Ensuite, l'obtention de structures trimériques post-fusion de LYSV G est intéressante puisque c'est probablement cette conformation qui intervient dans la formation des réseaux supramoléculaires visibles à la surface des particules virales et qui joueraient un rôle clé dans la finalisation du processus de fusion (voir **Introduction.II-C.2**) (Libersou et al., 2010, Belot et al., 2020, Zhou et al., 2022).

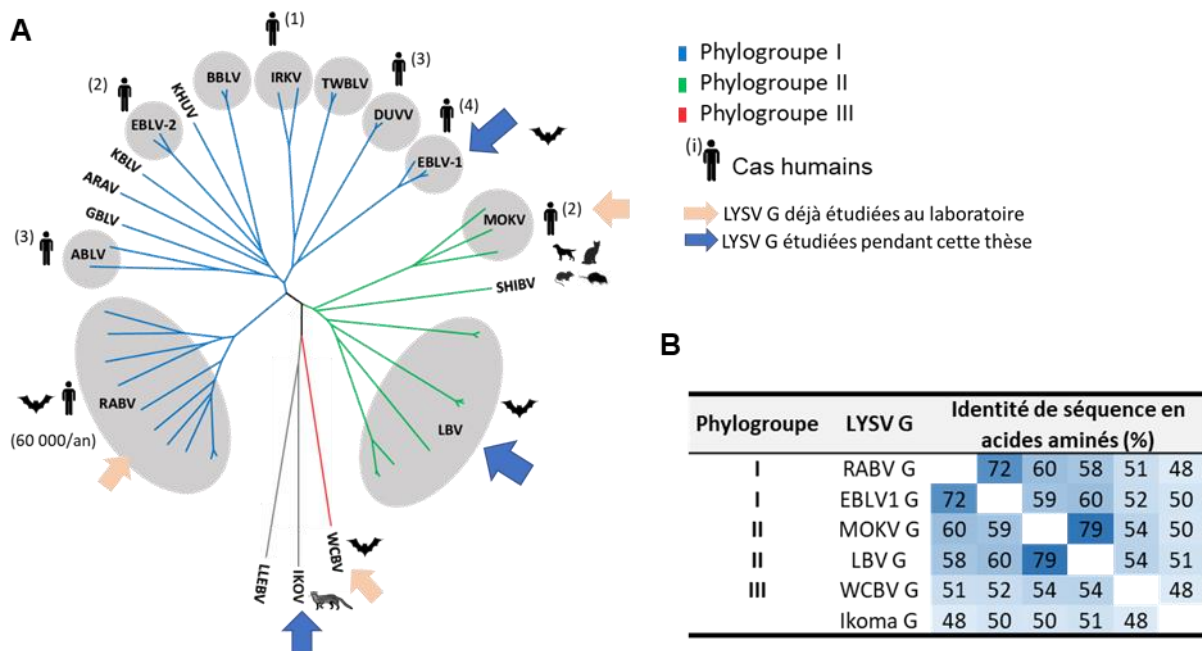
Enfin, l'obtention de structures complètes de LYSV G permettrait, au même titre que pour VSV G, d'affiner notre compréhension du rôle du CTD, du TMD et de la partie intravirale (ICD) de G lors du processus de fusion.



### Figure 51. Structures résolues des LYSV G

De gauche à droite : structure du trimère pré-fusion de RABV G (PDB : 7u9g), intermédiaire monomérique précoce (EI) de RABV G (PDB : 6lgx), intermédiaire monomérique tardif (LI) de RABV G (6lgw) et protomère post-fusion de MOKV G (6tmr). Le code couleur est le même qu'en **Figure 23**: en jaune, le domaine de fusion (FD), en orange le domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD), en rouge le domaine de trimérisation (TrD), en bleu foncée les boucles de fusion, en vert et bleu les charnières flexibles, en violet le domaine C terminale (R5) de l'ectodomaine. Le segment R5 est représenté en pointillée.

Dans le but d'acquérir des données structurales supplémentaires sur les LYSV G, les glycoprotéines du virus EBLV1 (phylogroupe I), du virus LBV (phylogroupe II) et du virus Ikoma (parmi les plus divergentes au niveau de la séquence en acides aminés) ont été choisies comme cibles d'intérêt (**Figure 52**). L'étude des G sélectionnées est principalement structurale et a été menée par cristallographie aux rayons X. Ce travail est cependant loin d'être achevé, et les perspectives à poursuivre sont présentées à la fin de ce chapitre.



### Figure 52. LYSV G étudiées au laboratoire

**(A)** L'arbre phylogénique des Lyssavirus est présenté ici : le phylogroupe I est en bleu, le II en vert et le III en rouge. Le phylogroupe I inclut notamment les nombreuses souches de virus de la rage (RABV), le virus Duvénage (DUV), les Lyssavirus de chauves-souris européennes de type I et II (EBLV I et II), de chauves-souris australiennes (ABLV), le virus Khujand (KHUV), le virus de chauve-souris Bokeloh (BBLV), le virus Irkut (IRKV) et le virus Aravan (ARAV). Le phylogroupe II regroupe le virus Lagos bat (LBV), le virus Shimoni bat (SHIBV) et le virus Mokola (MOKV). Les LYSV les plus divergentes, soient le virus de la chauve-souris ouest caucasienne (WCBV), le virus Ikoma et le virus LLeida (LLBV), n'appartiennent à aucun de ces phylogroupes. WCBV constitue le phylogroupe III à lui seul. Une flèche orange clair indique les LYSV G déjà étudiées au laboratoire, la flèche bleu foncé celles choisies pour cette thèse. **(B)** Identité de séquence en acides aminés (%) entre les différentes LYSV G étudiées.

En Europe, EBLV-1 est actuellement le LYSV le plus répandu et est essentiellement retrouvé dans les populations chauves-souris sérotonines (*Eptesicus serotinus* et *E. isabellinus*) (Roig-Lopez et al., 2014, Banyard et al., 2014, Marston et al., 2018, Folly et al., 2021). Les événements de franchissement de barrières d'espèces par ELBV-1 sont rares (Marston et al., 2018). Le dernier cas de transmission humaine remonte à 2019 en France (Regnault et al., 2021).

Le virus de la chauve-souris de Lagos, LBV, a été isolé pour la première fois sur une chauve-souris frugivore dans les îles Lagos au Nigeria en 1956 (Boulger et al., 1958), puis notamment chez des mammifères domestiques en Ethiopie et en Afrique du Sud (Markotter et al., 2006). C'est un LYSV qui a déjà fait l'objet d'études antigéniques approfondies (De Benedictis et al., 2016, Evans et al., 2018) bien que la structure de LBV G ne soit pas encore résolue.

Le virus Ikoma a été isolé en 2009 dans le cerveau d'une civette africaine (*Civettictis civetta*) présentant des signes de rage en Tanzanie, où la rage canine est endémique (Marston et al., 2012). Malgré un criblage d'une dizaine d'espèces de chauve-souris dans la région, aucun réservoir du virus Ikoma n'est identifié à ce jour chez la chauve-souris (Horton et al., 2014).

## **II. Matériel et méthodes**

### **Cellules**

Des cellules BSR sont cultivées dans du DMEM (Dubelco's modified eagle medium) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et supplémenté avec 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine dans une étuve à 37 °C avec une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules de drosophile Schneider 2 (S2) (Invitrogen) sont cultivées dans du milieu Express Five (Gibco) supplémenté avec 20 mM L-Glutamine et 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine. Les lignées stables S2 exprimant l'ectodomaine des LYSV G sont cultivées en présence de 7 µg/ml puromycine.

### **Plasmides et clonages**

Les gènes codant EBLV1 G WT (GenBank : MW551946.1), LBV G WT (GenBank : NC\_020807.1) et Ikoma G WT (GenBank : JX193798.1) ont été commandés chez Eurofins Genomics.

Pour l'expression transitoire dans les cellules BSR, les gènes codant les LYSV G sont sous-clonés dans le plasmide d'expression eucaryote pCAGGS par Gibson à l'aide du kit Gibson *assembly reaction kit* (New England Biolabs).

Pour l'expression stable en cellules S2, les boucles de fusion sauvages hydrophobes <sup>74</sup>FVGY<sup>77</sup> et <sup>121</sup>WL<sup>122</sup> ont été substituées par les séquences plus hydrophiles <sup>74</sup>GNGS<sup>77</sup> and <sup>121</sup>GS<sup>122</sup>. Les séquences des ectodomains avec les boucles de fusion mutées (G<sub>1-440</sub>\*) sont insérées dans le vecteur d'expression pT350 en phase entre une séquence codant pour un peptide signal BiP (en 5') permettant

leur sécrétion et une séquence codant pour un StrepTag II clivable par l'entérokinase (en 3') (séquence en acides aminés : DDDDKAG**WSHPQFEK**GGGSGGGSGGG**WSHPQFEK**) (Backovic et Krey, 2016). De façon similaire, pour la sélection d' $\alpha$ Reps dirigées contre Ikoma G, l'ectodomaine Ikoma G<sub>1-440</sub>\* a également été produit avec une étiquette 6HIS.

### **Test de fusion cellule-cellule**

Des cellules BSR à 70% de confluence sont co-transfectées avec le vecteur pCAGGS codant G WT et le vecteur pCDNA3.1 P-GFP codant la phosphoprotéine du virus de la rage fusionnée à la GFP par la méthode du phosphate de calcium. Les cellules sont transfectées avec 6  $\mu$ g de plasmides précipités dans un tampon HeBS (HEPES buffer saline) contenant 100 mM de CaCl<sub>2</sub>. Après 4h d'incubation à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, les cellules sont rincées et incubées dans du PBS-15% glycérol pendant 2 minutes afin d'augmenter l'efficacité de transfection. Les cellules transfectées sont ensuite rincées puis incubées 24h dans du DMEM 5% SVF à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Ensuite, les cellules sont incubées 10 min dans du DMEM à pH 5,0 ; pH 5,25 ; pH 5,5 ; pH 5,75 ; pH 6,0 ; pH 6,25 ; pH 6,5 et pH 7 (pH ajusté par ajout de MES 1M). Ces tampons sont préparés extemporanément et équilibrés à 37°C. Les cellules transfectées sont ensuite ré-incubées dans une solution de DMEM 10 mM HEPES pH 7,4 et 0,1% BSA préparée extemporanément pendant 1 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Elles sont ensuite fixées avec de la PFA 4% PBS 1X. Leurs noyaux sont marqués au DAPI. Les cellules sont observées au microscope EVOS M5000.

### **Production et purification des ectodomains de G de Lyssavirus**

Comme expliqué dans Backovic and Krey, 2016, les lignées de cellules S2 stables exprimant les protéines recombinantes EBLV1 G<sub>1-440</sub>\*, LBV G<sub>1-440</sub>\* et Ikoma G<sub>1-440</sub>\* ont été produites en co-transfectant des cellules S2 avec le plasmide pT350 contenant le gène codant l'ectodomaine et le plasmide codant le gène de résistance à la puromycine à l'aide du kit de transfection 1ml Effectene® Transfection Reagent (Qiagen).

Afin de produire les protéines recombinantes en quantité suffisante, les lignées S2 sont cultivées en suspension à 28°C et 120 rpm (incubateur à agitation orbitale SI600C) jusqu'à atteindre une densité de  $1,5 \cdot 10^7$  cellules/mL dans le milieu P (milieu synthétique Express Five (Gibco) supplémenté avec 20 mM L-Glutamine, 50 U/mL de pénicilline, 50  $\mu$ g/mL de streptomycine et 7  $\mu$ g/ml de puromycine). La production de la protéine d'intérêt est induite par l'ajout de CuSO<sub>4</sub> à une concentration finale de 500  $\mu$ M.

Après 5 jours d'induction, le surnageant des cultures est récolté par centrifugation (5000 rpm 10 min sur rotor JLA 16.250, centrifugeuse Avanti J-26 XP). Après ajout d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free Roche) et d'EDTA à 2 mM final, le surnageant est concentré par filtration tangentielle à l'aide d'une cassette VivaFlow 200 10 000 MWCO PES (Sartorius).



Les ectodomains sont ensuite purifiés à l'aide de leur étiquette SrepTag II par chromatographie d'affinité à l'aide d'une résine couplée à la streptavidine (Streptap, GE Healthcare) pré-équilibrée dans le tampon HNE (10 mM HEPES pH 7,4 200 mM NaCl 2 mM EDTA pH8).

L'éluion est réalisée grâce à un tampon HNE supplémenté avec 5 mM d' $\alpha$ -Desthiobiotine. Les ectodomains présentant les boucles de fusion mutées font l'objet d'une étape de purification supplémentaire par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne Superdex Increase S200 HR10/300 (GE HealthCare) préalablement équilibrée dans le tampon HNE. Les ectodomains purifiés sont ensuite concentrés jusque 5mg/ml (Amicon Ultra 30kDa c/o - Millipore-) et conservés à -80°C.

### **Observation par microscopie électronique par coloration négative des ectodomains de G de LYSV**

Les échantillons sont adsorbés sur une grille de 400 Mesh recouverte d'un film de carbone (Quantifoil R2/2). Les grilles sont séchées et trempées dans un colorant contenant des atomes de métaux lourds opaques aux électrons. Pour l'observation des ectodomains à pH acide, les échantillons sont colorés avec de l'acétate d'uranyle (AcU, pH 4,5) ; pour les observations à pH 7,5, la coloration des grilles est réalisée au phosphotungstate de sodium (NaPT). Les échantillons sont observés à l'aide d'un microscope Tecnai Spirit 120 kV (FEI) doté d'une caméra GATAN K2. Les échantillons sont observés à un grossissement compris entre 15000X et 21000X.

### **Cristallographie aux rayons X**

Les kits commerciaux de cristallisation (Classics lite et II, Mb Class I et II, PEGs I et II, Cryos, pH clear I et II, JCSG+ et MPD) contenant chacun 96 précipitants différents ont été utilisés pour tester les conditions de cristallisation des trois constructions EBLV1 G<sub>1-440</sub>\*, LBV G<sub>1-440</sub>\* et Ikoma G<sub>1-440</sub>\*. Les premiers essais de cristallisation sont réalisés à 20°C par goutte assise (100 nl de protéine + 100 nl de solution de cristallisation) en plaque TTP 96 puits (Corning) en utilisant le robot de cristallisation Mosquito LCP (LabTech TTP). L'optimisation des conditions de cristallisation et la croissance de cristaux est réalisée par gouttes pendantes contenant des volumes identiques (1  $\mu$ L) de protéines et de solution de cristallisation. Les cristaux sont observés au bout de 1-2 jours, et matures au bout de 5 jours. Ils sont congelés dans leur solution de cristallisation supplémentée de 35% v/v glycérol comme cryo-protectant. Les cristaux sont testés sur les lignes Proxima 1 et 2 du synchrotron SOLEIL.

### **Détermination de la structure de Ikoma G<sub>1-440</sub>\***

Les données de diffraction sont indexées, intégrées et réduites en utilisant le programme XDS (Kabsch, 2010). Le cristal de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* appartient au groupe d'espace P212121 (P19).

La structure de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* est résolue par remplacement moléculaire, en suivant la méthode développée dans Terwilliger et al., 2023. Il s'agit d'une procédure automatisée qui consiste en des

cycles prédictifs de structures en utilisant AlphaFold2 (Jumper et al., 2021) et d'affinement (ajustement des modèles produits dans la carte de cristallographie aux niveaux de grands blocs structuraux), remplacement moléculaire (1<sup>er</sup> cycle), alignement des prédictions obtenues sur le modèle de remplacement moléculaire, affinement, reconstruction du modèle et *trimming* (Terwilliger et al., 2023). Le détail des étapes spécifique à cette étude est présenté en **IV**. L'étape de remplacement moléculaire est réalisée avec MOLREP (Vagin et al., 1997) en utilisant la prédiction AlphaFold2 de l'ectodomaine de Ikoma G et la structure de MOKV G (PDB : 6tmr). L'étape d'affinement est réalisée avec BUSTER-2.10.4 (Bricogne et al., 2017). Les dernières étapes de constructions sont réalisées dans COOT (Emsley et al., 2010).

### **Screen de la banque d' $\alpha$ Reps contre Ikoma G<sub>1-440</sub>\***

Les  $\alpha$ Reps sont une famille de protéines biosynthétiques constituées de répétitions hélicoïdales. La librairie 2.1 sur laquelle la sélection est faite contient  $\sim 1,7 \cdot 10^9$  clones indépendants et a été décrite précédemment (Guellouz et al., 2013). Cette banque contient des variants avec une surface hypervariable au niveau de la surface liaison (Valerio-Lepiniec et al., 2015). Le screen de cette banque est réalisé par phage display, comme décrit dans Hadpech et al., 2017, avec des modifications mineures, sur trois cycles de sélection.

L'ectodomaine Ikoma G<sub>1-440</sub> exprimé avec une étiquette 6His est immobilisé soit directement par adsorption sur une plaque 96 puits, soit sur une plaque ELISA 96 puits pré-recouverte de Ni<sup>++</sup>-NTA-biotine streptavidine, à 4°C sur la nuit. Après rinçage avec un tampon HNET (HNE Tween 0,1%), les plaques de sélection sont saturées avec du tampon HNET supplémenté avec 2% w/v BSA pendant 1h puis rincées au HNET. 100  $\mu$ L de la banque 2.1 sont déposées par puit, et les plaques sont incubées 2h à 4°C avec agitation. Après rinçage au HNET, les phages liés sont élués à l'aide de 0,1M glycine HCl pH 2,5 puis tamponnés par ajout de 1M Tris. La population de phages élués, sélectionnés contre Ikoma G<sub>1-440</sub>, est amplifiée par transformation de bactéries XL1-Blue et sert de banque d' $\alpha$ Reps pour le tour de sélection suivant. A la fin du troisième tour de sélection, les phages présents dans la population éluee sont sélectionnés et amplifiés comme décrit précédemment (Valerio-Lepiniec et al., 2015).

La capacité de liaison à Ikoma G<sub>1-440</sub>\* des phages sélectionnés est testée par phage ELISA. Deux cibles ont été utilisées pour cet ELISA : soit Ikoma G<sub>1-440</sub> streptag II, directement adsorbée sur la plaque d'ELISA, soit Ikoma G<sub>1-440</sub> 6His, immobilisée comme indiqué précédemment, à 4°C sur la nuit. Après rinçage au HNET, les plaques sont bloquées avec du tampon HNET 2% BSA pendant 1h avec agitation à RT. Après un nouveau rinçage, les plaques sont incubées avec 100 $\mu$ L/puit d'aliquots des phages sélectionnés au tour 3 pendant 1h à RT et avec agitation. Après rinçage, les plaques sont incubées en présence de l'anticorps murin HRP-conjugué anti-M13 (Interchim) dilué au 1:2000 dans du HNET 2% BSA pendant 1h. Après rinçage, 100 $\mu$ L de substrat BM Blue POD (Roche) est ajouté dans chaque puit.

La réaction est stoppée par ajout de 1N HCl, et l'absorbance est mesurée à 450nm. Les clones montrant une liaison forte à la cible sont séquencés.

### **Production et purification des $\alpha$ Reps sélectionnées à Ikoma G<sub>1-440</sub>\***

Les  $\alpha$ Reps sélectionnés sont produites comme décrit précédemment (Thébault et al., 2022). Les gènes codant pour ces  $\alpha$ Reps sont sous-clonés dans le vecteur d'expression bactérien pQE81. La production de ces  $\alpha$ Reps est réalisée en bactéries C41, après induction par 1mM IPTG 4h à 37°C. Le culot bactérien récolté après centrifugation (5000g 30min 4°C) est resuspendu dans du tampon HNE. La lyse bactérienne est réalisée par sonication sur glace (5x 30s pour ~40% d'amplitude et 30s de repos). Le lysat est ensuite clarifié par centrifugation (10000g 30min 4°C). Les  $\alpha$ Reps solubles sont ensuite purifiées à l'aide de leur étiquette HIS par chromatographie d'affinité sur colonne Hisrap, (Cytiva) pré-équilibrée dans le tampon HN (10 mM Hepes, 200mM NaCl). Une dernière étape de purification est réalisée par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne Superdex Increase S200 HR10/300 (Cytiva) préalablement équilibrée dans le tampon HNE. Les fractions contenant les  $\alpha$ Reps sont ensuite concentrées (Amicon Ultra 3kDa c/o - Millipore-) et conservées à -20°C.

### **Test d'interaction des $\alpha$ Rep sélectionnées avec Ikoma G<sub>1-440</sub>\***

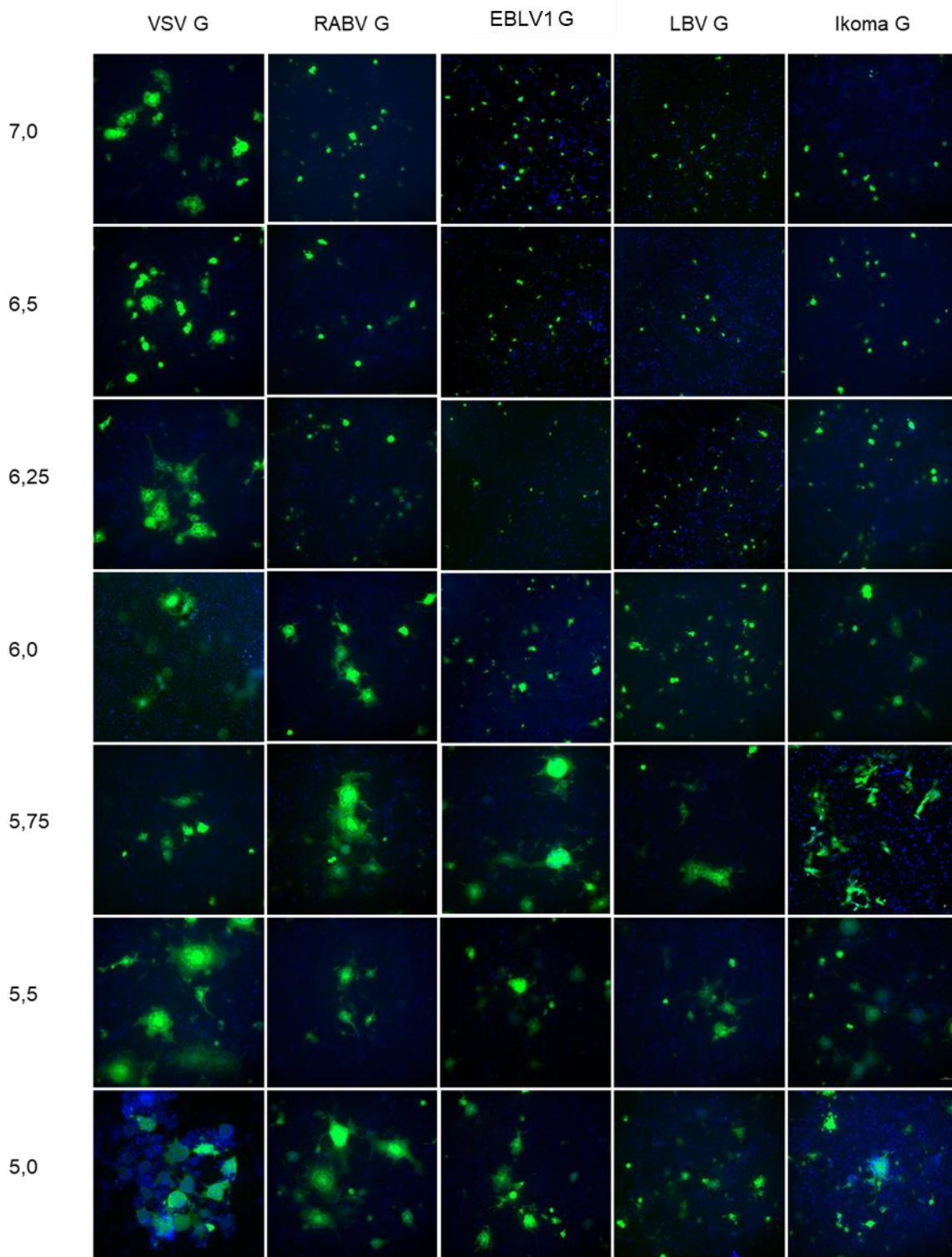
Des tests rapides d'interaction entre les  $\alpha$ Reps sélectionnées et leur cible Ikoma G<sub>1-440</sub>\* sont réalisés par *pull-down*. Dans un cas, Ikoma G<sub>1-440</sub>\* avec l'étiquette StrepTag II est préalablement incubé avec des billes magnétiques streptactine XT (MagStrep® Strep-Tactin®XT) 1h à RT, dans l'autre, ce sont les  $\alpha$ Reps possédant un tag 6His qui sont pré-incubées avec des billes magnétiques Ni-NTA (Ni-NTA Magnetic Beads, NEB). Après rinçage, les  $\alpha$ Reps et Ikoma G<sub>1-440</sub>\* sont respectivement ajoutés et les solutions sont incubées pendant 1h 20°C 100 rpm. Après rinçage, la double présence de la cible et du binder testé est évaluée par SDS-PAGE.

### III. Étude fonctionnelle de la G des Lyssavirus

Les séquences de LYSV G disponibles dans les bases de données correspondent pour la plupart à des séquences provenant d'isolats récupérés sur plusieurs espèces de mammifères dont beaucoup sur des chauves-souris. Ces séquences sont pour beaucoup un consensus obtenu suite au séquençage de génomes viraux issus de ces isolats. Elles correspondent donc au génome moyen du spectre de mutants constituant une population virale. Du fait de ce moyennage, ces séquences peuvent ne pas être fonctionnelles. Il est donc nécessaire de confirmer le caractère fonctionnel des séquences disponibles dans ces bases avant toute étude structurale.

L'activité de fusion des LYSV G sélectionnées a donc été évaluée par des tests de fusion cellule-cellule (**Figure 53.A**). Pour cela, des cellules BSR ont été co-transfectées avec un plasmide pCAGGS codant pour la glycoprotéine d'intérêt et un plasmide codant pour la phosphoprotéine du virus de la rage fusionnée à la GFP (P-GFP). P-GFP ne pouvant pas diffuser dans le noyau des cellules transfectées (Pardollou et al., 2005), ce marquage permet la visualisation et le décompte des syncytia formés. Les cellules sont transfectées par précipitation de l'ADN par du phosphate-calcium. Après 20 h de transfection, les cellules sont incubées 10 min à 37°C dans différentes solutions tamponnées pour des pH compris entre 5 et 7. Les milieux sont ensuite remplacés par un milieu tamponné à pH 7,4 pendant 1 h à 37°C. Cette étape permet d'achever la formation des syncytia et la diffusion de la P-GFP dans le cytoplasme.

Dans ces conditions, à l'instar de ce qui est observé pour VSV G, la formation de syncytia (plus de 10 noyaux) est observée à bas pH pour toutes les cellules exprimant les différentes LYSV G (**Figure 53.B**). Ceci confirme le caractère fonctionnel des séquences extraites des bases de données disponibles. L'activité de fusion des LYSV G est optimale autour de pH 6,0-5,75, ce qui est légèrement inférieur à ce qui est observé pour VSV G (**Figure 53.B**). Ces résultats sont observés pour des taux de transfections similaires, de l'ordre de 10 % des cellules. En revanche, il n'a pas été possible de comparer les taux d'expression des différentes LYSV G à la surface des cellules transfectées, ne disposant pas d'anticorps ciblant spécifiquement EBLV1 G, LBV G et Ikoma G.



**Figure 53. Les séquences des LYSV G choisies pour cette étude sont fonctionnelles**

Comparaison de l'activité de fusion de différentes LYSV G considérées pour cette étude (ELBV 1, LBV, Ikoma) avec celle de RABV G et VSV G. Les images sont représentatives des lamelles.

La mise en évidence de la capacité à fusionner des différentes LYSV G confirme que ces protéines sont fonctionnelles ainsi que correctement repliées et présentées à la surface des cellules BSR.

## IV. Étude structurale de la G des Lyssavirus

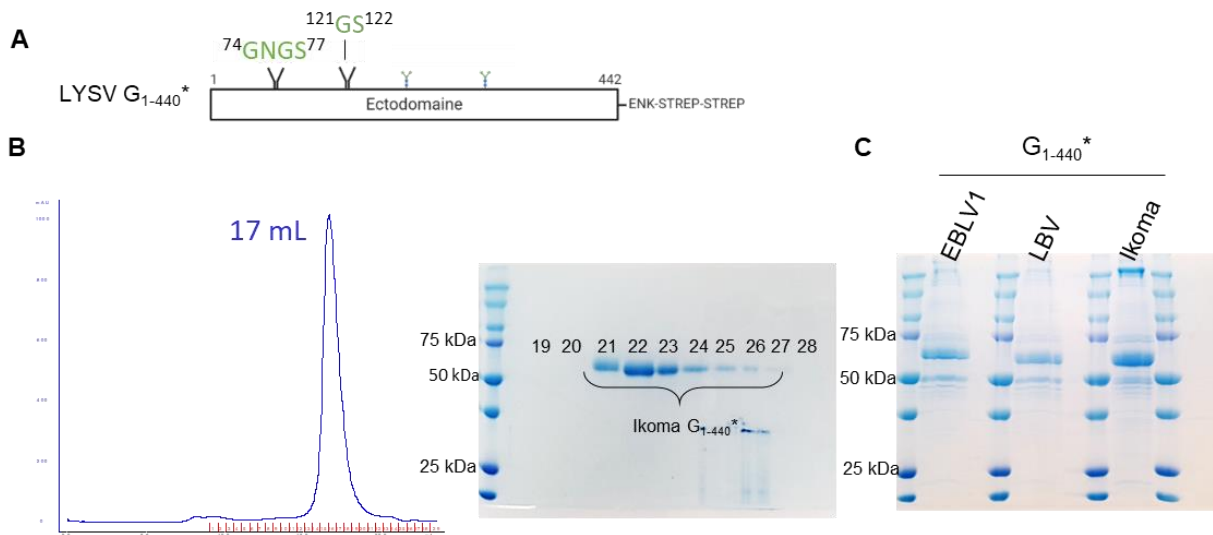
Les LYSV G sont des protéines glycosylées. Leur expression requiert donc l'utilisation d'un système d'expression eucaryote. Pour cela, des lignées stables sont établies en cellules de Drosophile S2, approche régulièrement utilisée pour produire les ectodomaines de protéines de fusion virales (Backovic et Krey, 2016, Belot et al., 2020, Beilstein et al., 2020, Callaway et al., 2022, Barba-Spaeth et al., 2016, Gandolfo et al., 2021, Rouvinski et al., 2015, Meola et al., 2024).

Les cellules S2 sont transfectées avec un plasmide pT350 codant l'ectodomaine d'intérêt. Ce plasmide permet la sécrétion de l'ectodomaine directement dans le milieu de culture grâce à la présence de la séquence signalale BiP de Drosophile en aval d'un promoteur inducible aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  à l'extrémité N-terminale et à la présence d'une étiquette StrepTag II clivable par l'entérokinase du côté C terminal (**Figure 54.A**). L'expression de l'ectodomaine recombinant est induite par ajout d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  dans le milieu de culture.

### **A. Expression, purification et caractérisation des ectodomaines de EBLV1 G, LBV G et Ikoma G**

L'ectodomaine des LYSV G est constitué de 440 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 50 kDa. Les séquences des boucles de fusion sont systématiquement mutées ( $^{72}\text{TNFVGYVTTT}^{81} \rightarrow ^{72}\text{TNGNGSVTTT}^{81}$  et  $^{116}\text{YPDNSWLRT}^{124} \rightarrow ^{116}\text{YPDNSGSRT}^{124}$ ) afin d'augmenter le rendement de production en rendant les LYSV G plus solubles, comme cela a été observé précédemment (Belot et al., 2020) (**Figure 54.A**). Ces constructions seront appelées  $\text{G}_{1-440}^*$  par la suite.

Après récolte et concentration du surnageant,  $\text{G}_{1-440}^*$  est purifiée en deux étapes : une chromatographie d'affinité suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille. Le profil d'élution associé à cette dernière étape de purification est présenté en **Figure 54.B**. Les différentes LYSV  $\text{G}_{1-440}^*$  sont éluées à un volume proche de 17 mL sur une colonne d'exclusion Superdex S200 Increase HR10/30 (**Figure 54.B**), ce qui est compatible avec le poids d'une protéine globulaire en solution de 50 kDa : LYSV  $\text{G}_{1-440}^*$  est monomérique en solution à pH 7,0. Ces observations sont confirmées par la caractérisation des LYSV  $\text{G}_{1-440}^*$  par microscopie électronique en coloration négative (**Figure 55**).

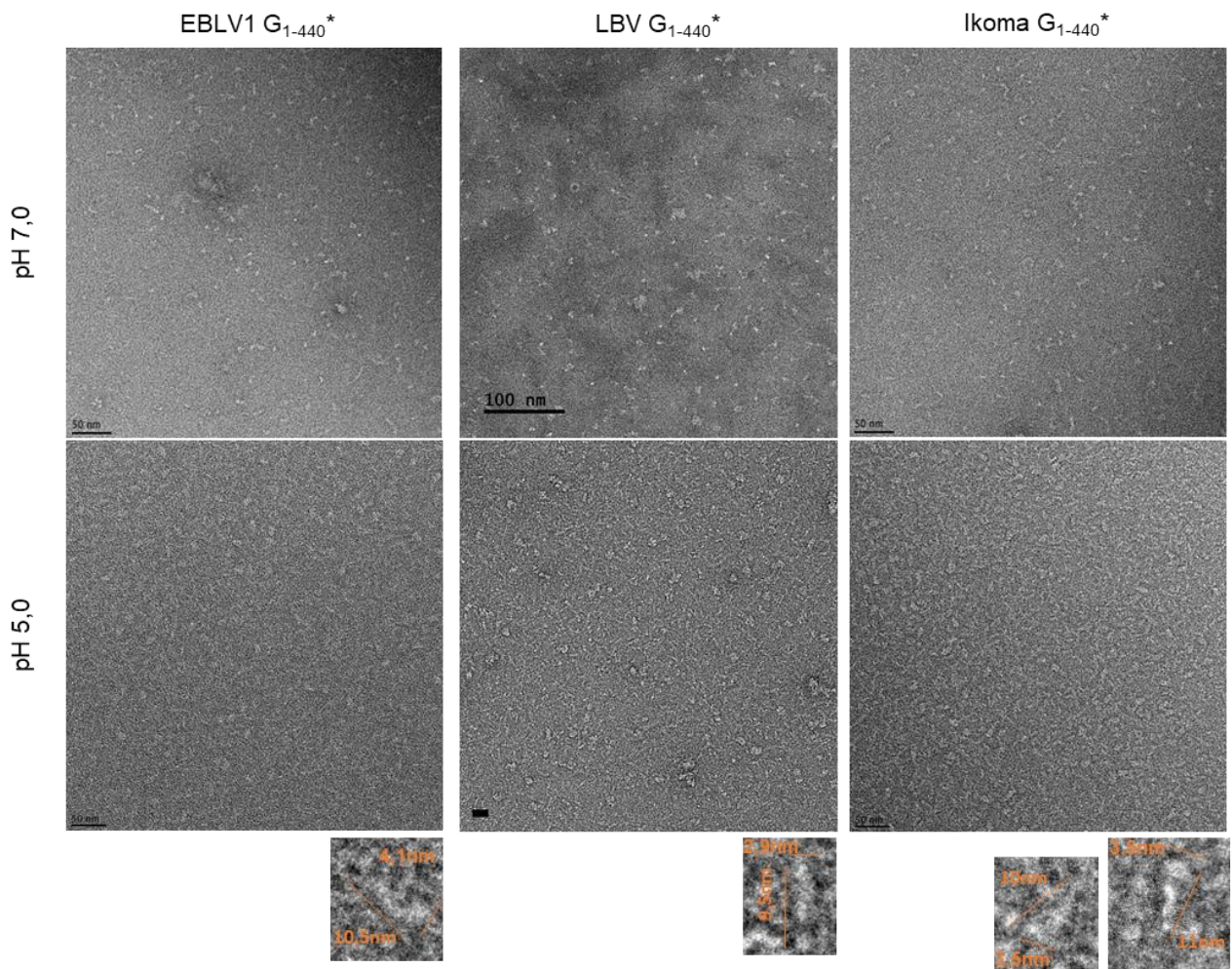


**Figure 54. Expression et purification des LYSV G<sub>1-440</sub>\***

**(A)** Organisation de l'ectodomaine des LYSV G muté au niveau des boucles de fusion (en vert). **(B)** Profil d'élution de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* de la chromatographie d'exclusion de taille (Superdex S200 Increase HR10/30). Le pic central contient l'ectodomaine de Ikoma G et correspond à un volume d'élution de ~17mL. Le gel SDS-PAGE associé à cette étape de purification est présenté. **(C)** Gel SDS-PAGE présentant les protéines purifiées.

Comme G est une protéine sensible au pH, les observations en coloration négative ont été réalisées à pH neutre (pH 7,0) et pH acide (pH 5,5). L'abaissement du pH est réalisé par ajout de MES 1M pH 5,0 suivi d'une incubation de 2h à 37°C sous agitation. Si les échantillons sont observés à pH 7,0, ils sont colorés au phosphotungstate de sodium (NaPT pH 7,0), s'ils sont observés à pH 5,0, ils sont colorés à l'acétate d'uranyle (AcU, pH 4,5).

A pH 7, les objets observés ne semblent pas présenter de structure spécifique, comme cela a déjà été observé pour l'ectodomaine de G du virus Mokola (phylogroupe II, Belot et al., 2020). Cela est probablement dû à la flexibilité du monomère G<sub>1-440</sub>\* à pH neutre (Belot et al., 2020). A pH5, en revanche, il est possible de distinguer des structures plus allongées, d'une longueur proche de celle attendue pour le protomère allongé post-fusion de G<sub>1-440</sub> (**Figure 55**).



**Figure 55. Morphologie des LYSV G<sub>1-440</sub>\* en coloration négative à pH 7,0 et pH 5,0**

Une micrographie représentative de chaque condition testée est présentée ici. Les échelles sont indiquées. Des agrandissements des structures allongées observées à pH acide sont présentées en dessous des micrographies, les dimensions étant indiquées. A pH7,0, aucune structure n'est clairement identifiable.



## **B. Détermination de la structure de Ikoma G<sub>1-440</sub>\***

Les ectodomains purifiés de EBLV1 G, LBV G et Ikoma G ont fait l'objet d'un criblage en utilisant les kits commerciaux Classics lite et II, Mb Class I et II, PEGs I et II, Cryos, pH clear I et II, JCSG+. Au cours de ces screens initiaux, seulement deux conditions de cristallisation ont été identifiées pour Ikoma G<sub>1-440</sub>\*, et aucune pour EBLV1 et LBV G<sub>1-440</sub>\*.

Les deux conditions de cristallisation de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* identifiées contiennent toutes les deux du polyéthylène glycol 4000 (PEG), un pH entre 7,0 et 7,5 et NaCl comme sel. Les cristaux obtenus après 4 jours d'incubation sont uniques et de taille satisfaisante pour la condition 1 et organisés en clusters d'aiguilles pour la condition 2.

La condition 1 a été optimisée à la main par gouttes pendantes en variant le tampon, la pH et la concentration en sel et en PEG. La condition finale retenue permettant l'obtention de cristaux de suffisamment bonne qualité pour une collecte est obtenue en mélangeant 1µL de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* à 4 mg/mL avec 1µL de solution de cristallisation contenant 100mM Hepes pH7,5 100mM NaCl 6% PEG 4000.

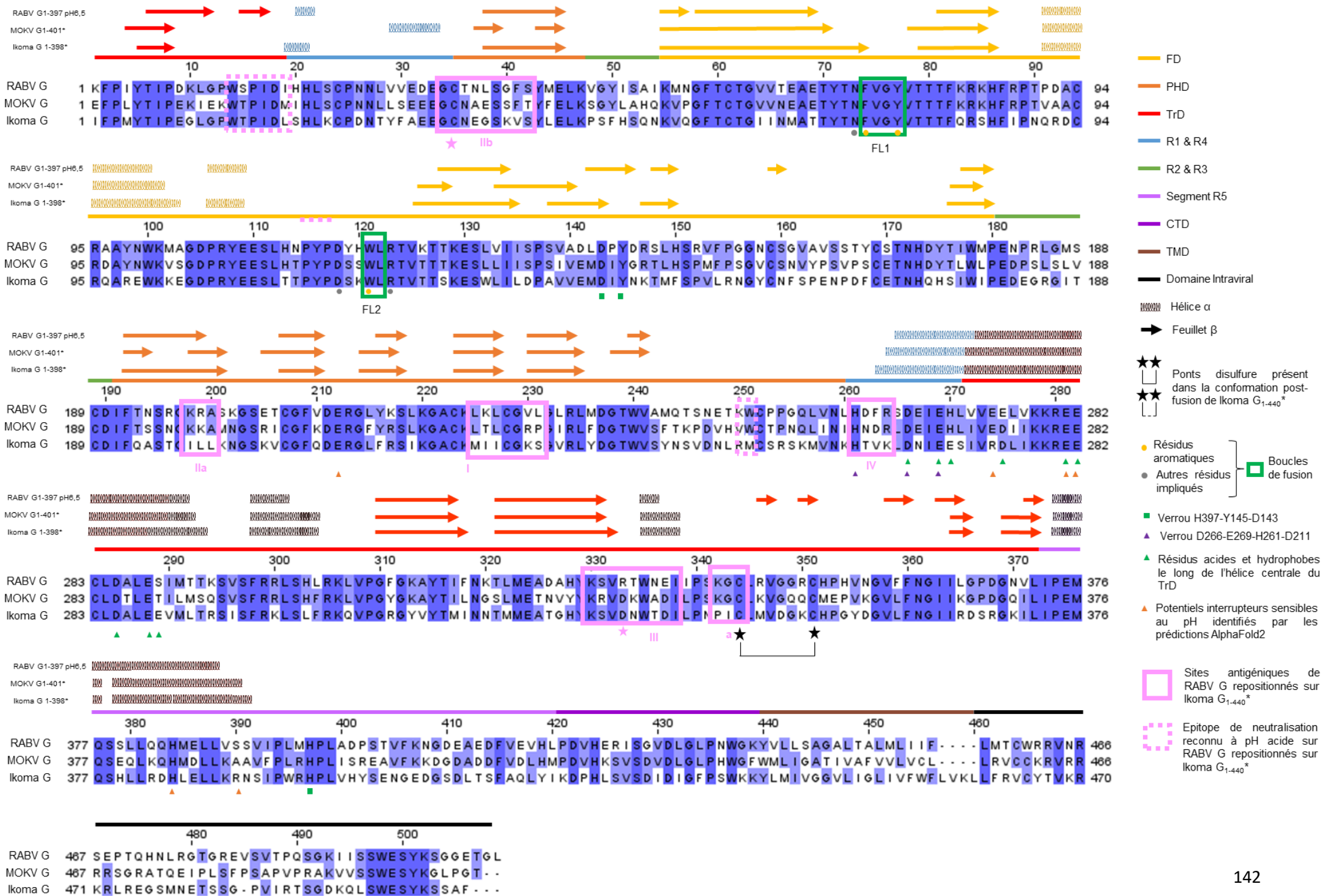
Les données de diffraction aux rayons X ont été collectées sur les lignes PROXIMA 1 et 2A du synchrotron SOLEIL. Les cristaux présentent une anisotropie non négligeable ainsi qu'une maille multiple et diffractent jusqu'à 2,2 Å dans une direction, et 3,2 Å dans une autre direction. Le groupe d'espace est P212121 (P19). L'unité asymétrique contient une seule protéine (**Table 3**).

La structure de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* a été déterminée par remplacement moléculaire selon la méthode proposée par Terwiliger et al., 2023, en collaboration avec Pierre Legrand (SOLEIL, Proxima 1). Le modèle utilisé pour effectuer ce remplacement moléculaire est issu de cycles itératifs de prédiction utilisant AlphaFold2 (Jumper et al., 2021). Une première prédiction de la structure de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* est réalisée. Cette première prédiction et la structure post-fusion de l'ectodomaine du virus Mokola (PDB : 6tmr) servent de modèles initiaux aux cycles itératifs (cinq) de prédictions utilisant AlphaFold2. A chaque cycle, les deux meilleurs modèles prédictifs sont choisis puis utilisés comme modèle pour le cycle de prédiction d'après. Ces étapes d'affinement sont réalisées avec BUSTER-2.10.4 (Bricogne et al., 2020) en utilisant les groupes TLS, les contraintes NCS et l'approche par contraintes de similarités structurales locales (Smart et al., 2012). Les étapes de construction sont réalisées dans COOT v.0.9.6. La **Table 3** récapitule les statistiques d'affinement actuelles. Les données de collecte et de reconstruction du modèle sont présentées dans la **Table 3**.

**Table 3. Données collectées et statistiques d'affinement**

<b>Data collection</b>	
Resolution range	45.28 – 2.20 (2.23-2.20)
Space group	P212121
Unit cell	a=46.16 Å, b= 59.93 Å, c=231.99 Å
Mean I/sigma(I)	9,16
CC1/2	99.9 (55.0)
<b>Refinement statistics</b>	
Reflections used for R <sub>free</sub>	1009 (0,0482)
R <sub>work</sub>	0,285
R <sub>free</sub>	0,323
Number of non-hydrogen atoms	3183
macromolecules	3183
Ligands	0
Protein residues	398
RMS (bonds)	0,28
RMS (angles)	0,66
Ramachandran favored (%)	91,16
Ramachandran allowed (%)	8,59
Ramachandran outliers (%)	0,25
Clashscore	0 (60 avec H)
Average B-factor	60,0

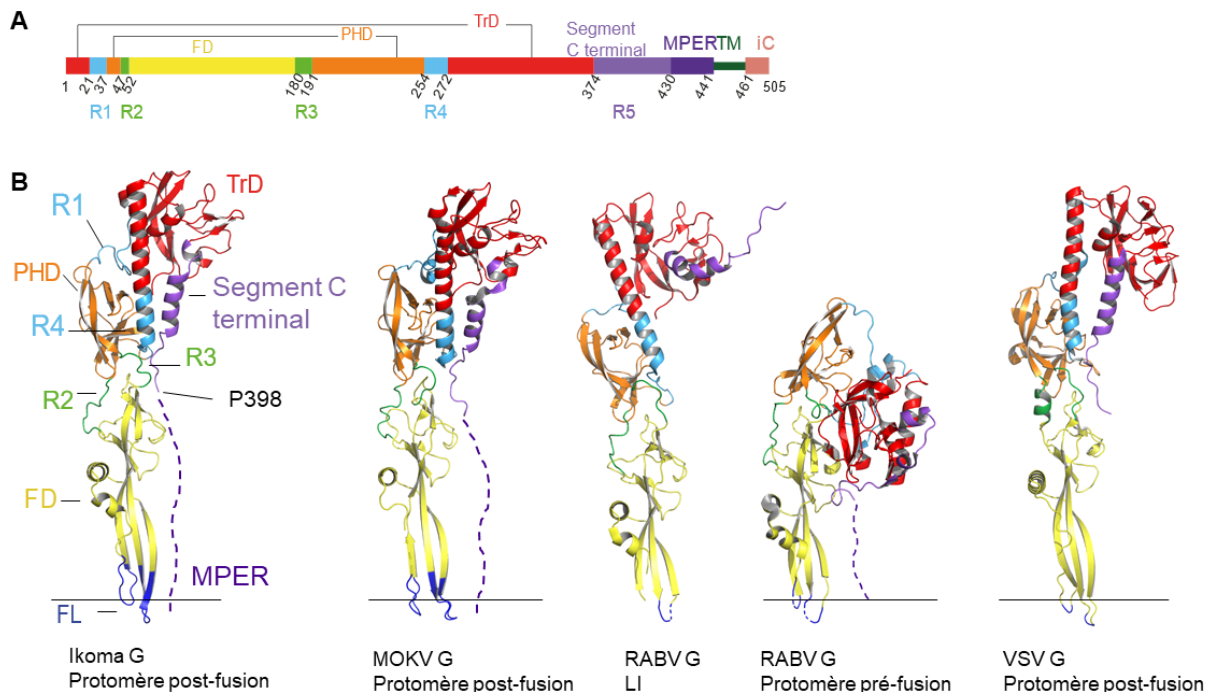
La chaîne de Ikoma G a pu être tracée des résidus 1 à 398, la structure présente une résolution allant jusqu'à 2,2 Å de résolution. A l'instar des glycoprotéines de classe III, l'ectodomaine de Ikoma G est organisé en trois domaines structuraux reliés entre eux par des régions charnières. Cet ectodomaine est lui-même relié au domaine transmembranaire par le CTD (Roche et al., 2006, 2007) (**Figure 57**). Les domaines structuraux du modèle obtenu ont été déterminés par alignement structural contre RABV G (PDB : 6lgw) et MOKV G (PDB : 6tmr) (**Figure 56, Figure 57.B**).



### Figure 56. Alignement de séquences des LYSV G dont la structure a été résolue

Les séquences utilisées pour l'alignement de séquence correspondent aux entrées P08667 (souche PV de RABV), POC572 (MOKV) et J7JVS8 (virus Ikoma). Les structures du trimère pré-fusion et des intermédiaires précoces et tardifs de RABV G<sub>1-440</sub> ont été résolues, ainsi que le protomère post-fusion de MOKV G<sub>1-440</sub>\* et Ikoma G<sub>1-440</sub>\*. Les structures secondaires sont représentées par une flèche (feuillet β) et des hélices (hélices α). Les structures secondaires indiquées pour RABV G correspondent à celles de l'intermédiaire tardif de RABV G (PDB : 6glw). Les cystéines 344 et 351 impliquées dans un pont disulfure supplémentaire par rapport aux G de Vésiculovirus sont indiquées par des étoiles noires, les résidus constitutifs des boucles de fusion (FL1, FL2) par des ronds jaune (résidus aromatiques) et gris. Le verrou D143-Y145-H397 est indiqué par des carrés verts, les résidus acides et hydrophobes présents le long de l'hélice centrale du TrD par des triangles verts, le verrou D266-E269-H261-D211 par des triangles violets, le verrou H397-Y145-D143 par des carrés verts et les potentiels interrupteurs sensibles au pH identifiés par les prédictions AlphaFold2 par des triangles oranges. Les sites antigéniques I, IIa et IIb, III, IV et a identifiés sur RABV (souches CVS et ERA) sont encadrés en rose.

Les trois domaines structuraux qui constituent l'ectodomain d'Ikoma G (FD, PHD et TrD) présentent une homologie structurale importante avec ceux de RABV et MOKV (**Table 4**) (Belot et al., 2019, Yang et al., 2020, Ng et al., 2022, Callaway et al., 2022). Leur organisation topologique est identique à celle retrouvée chez les autres glycoprotéines de classe III : le domaine FD est inséré dans une boucle du PHD, lui-même inséré dans une boucle du TrD (Roche et al., 2006,2007, Yang et al., 2020, Belot et al., 2019, Heldwein et al., 2006, Vollmer et al., 2020) et relié les uns aux autres par des charnières flexibles (**Figure 57**).



### Figure 57. Structure du protomère post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub>\*

(A) L'organisation de Ikoma G est présentée en suivant le même code couleur que précédemment. (B) La structure du protomère post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* est présentée à gauche. Les domaines FD, PHD et TrD sont indiqués, ainsi que les régions charnières R1-4. Le segment R5 est incomplet, la partie non résolue est indiquée en pointillée. La chaîne tracée va des résidus 1 à 398. Les structures d'autres LYSV

G sont également présentées : celles du monomère de MOKV G sous la conformation post-fusion, l'intermédiaire tardif de RABV G (LI, PDB : 6glw) et RABV G sous la conformation pré-fusion (PDB : 7u9g). Le protomère post-fusion de VSV G est également représenté, pour comparaison avec la glycoprotéine des Vésiculovirus (PDB : 5i2m).

**Table 4. Conservation de la structure des domaines FD, PHD et TrD des LYSV G**

La valeur RMSD et le nombre de carbones  $\alpha$  superposables sont indiqués pour chacun des trois domaines et correspondent à la comparaison de la structure obtenue pour Ikoma G<sub>1-440</sub>\* avec l'ectodomaine de RABV G dans ses différentes conformations et le protomère post-fusion de MOKV G.

Domaine structural	Nombre de résidus	Ikoma G / RABV G pré-fusion (7U9G)	Ikoma G / RABV G EI (6LGX)	Ikoma G / RABV G LI (6LGW)	Ikoma G / MOKV G post-fusion (6TMR)	Ikoma G / VSV G post-fusion (5i2m)
FD	128 (53-181)	0,992 (93 C $\alpha$ )	0,763 (79 C $\alpha$ )	0,698 (91 C $\alpha$ )	1,393 (91 C $\alpha$ )	1,562 (91 C $\alpha$ )
PHD	72 (37-46 et 91-254)	1,006 (66 C $\alpha$ )	1,329 (70 C $\alpha$ )	0,895 (67 C $\alpha$ )	0,864 (62 C $\alpha$ )	2,221 (36 C $\alpha$ )
TrD	121 (1-21 et 273-374)	0,856 (91 C $\alpha$ )	0,772 (91 C $\alpha$ )	1,046 (100 C $\alpha$ )	0,956 (100 C $\alpha$ )	2,209 (73 C $\alpha$ )

De façon similaire à ce qui a été observé chez les autres LYSV G, le domaine de fusion FD d'Ikoma G<sub>1-440</sub>\* ne présente pas d'équivalent du pont disulfure présent à l'extrémité du FD des G des Vésiculovirus (Belot et al., 2019, Callaway et al., 2022) (**Figure 58.A**). L'organisation du segment 110-117 n'avait pas pu être définie sur la conformation post-fusion de MOKV G (Belot et al., 2020), et seulement partiellement chez RABV G (Yang et al., 2020) (**Figure 58.A**). La structure résolue d'Ikoma G<sub>1-440</sub>\* montre que ce segment se replie en hélice du résidu 106 à 112 puis relie la deuxième boucle de fusion par un segment flexible (en rose, **Figure 58.A**). L'organisation des boucles de fusion de Ikoma G est identique à celle de RABV G et MOKV G : bipartites, présentant à leur extrémité les positions correspondant aux motifs de fusion. Les motifs de fusion définis pour les Lyssavirus sont les suivant : {<sup>74</sup>FVGY<sup>77</sup>, <sup>121</sup>WL<sup>122</sup>}. Les résidus aromatiques F74, Y77 et W121 sont effectivement localisés à l'extrémité du domaine de fusion (**Figure 58.B**).

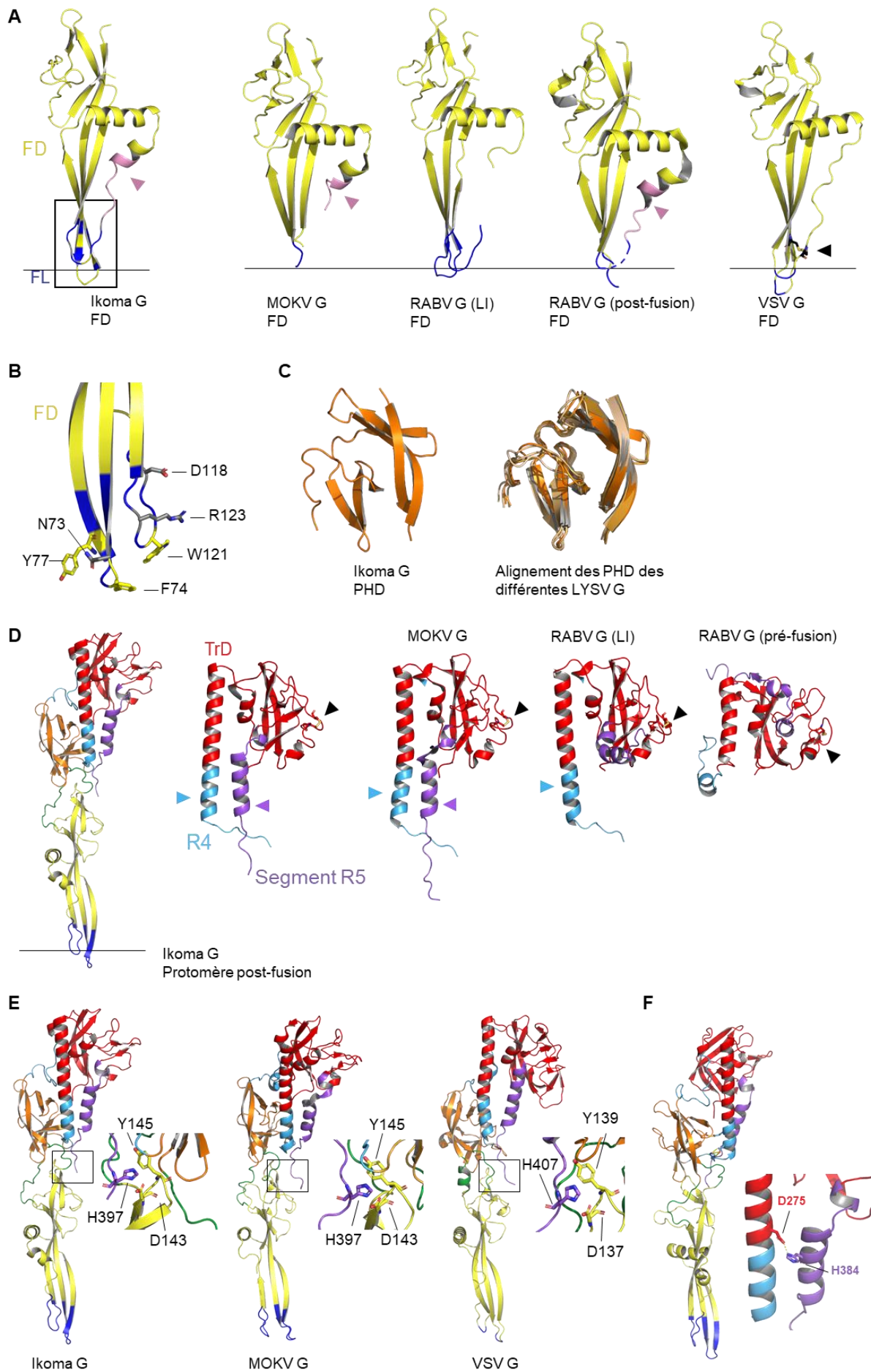
A la différence de ce qui est observé chez les Vésiculovirus (Baquero et al., 2015b), l'organisation du domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD) varie très peu d'une glycoprotéine de Lyssavirus à l'autre (**Figure 58.C, Figure 57**). L'organisation structurale du TrD est également bien conservée (**Figure 58.D, Table 4**). Le pont disulfure formé par les cystéines 344 et 351 chez les Lyssavirus est présent (**Figure 58.D**, Belot et al., 2019). L'organisation des régions charnières R1 à 3 est également conservée avec les autres structures de LYSV G.

La structure allongée de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* ressemble aux protomères post-fusion de MOKV G, VSV G et CHAV G (Belot et al., 2019, Yang et al., 2020, Baquero et al., 2015b) (**Figure 57**). En particulier, le segment R4 est replié en une hélice  $\alpha$  qui prolonge l'hélice centrale du TrD et qui permet la formation du motif de trimérisation typique des conformations post-fusion des glycoprotéines de classe III (Roche et al., 2006, Heldwein et al., 2006) (**Figure 58.D**). Ensuite, le CTD est aussi replié en hélice  $\alpha$  et les résidus D143, Y145 et H397 forment un *cluster* de façon identique à ce qui est observé sur le protomère

post-fusion de MOKV G (**Figure 58.D**). Ces résidus permettent de stabiliser la conformation post-fusion en épingle à cheveux à pH acide, et notamment de repositionner le segment CTD à proximité du FD, ce qui n'est pas le cas sur l'intermédiaire tardif de RABV G (Yang et al., 2020) (**Figure 58.E**). De même, comme pour ce qui a été observé sur le protomère post-fusion de MOKV G (Belot et al., 2020), les résidus D275 (TrD) et H384 (segment R5) participent également à stabiliser la conformation post-fusion (**Figure 58.F**). La structure résolue de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* correspond donc à la conformation du protomère post-fusion de G.

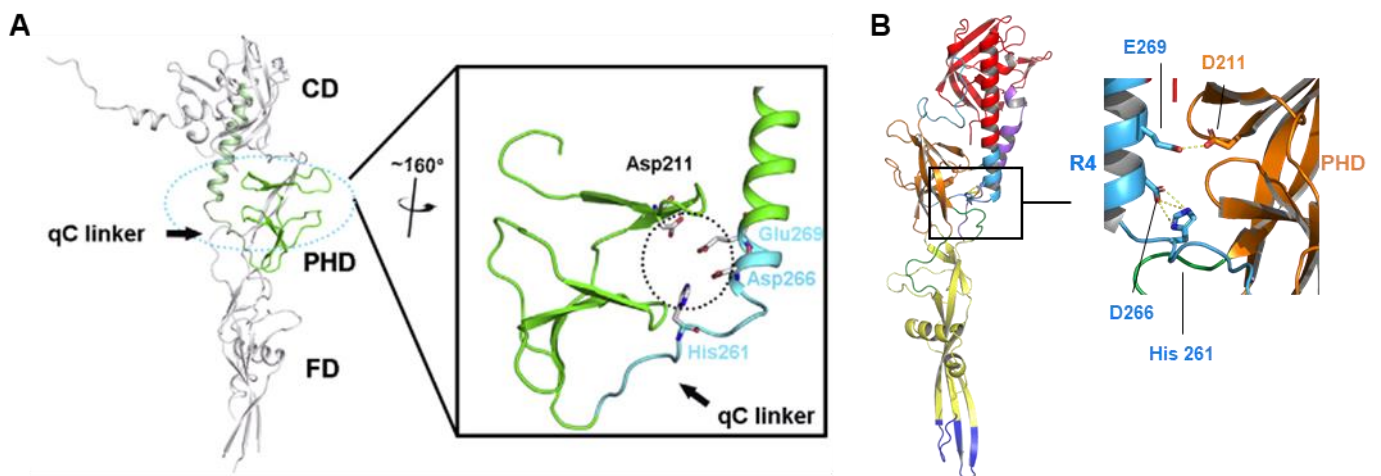
**Figure 58. Comparaison de l'organisation de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* avec les structures résolues de LYSV G et de G des Vésiculovirus**

**(A)** Comparaison des domaines de fusion d'Ikoma G, MOKV G (PDB : 6tmr), RABV G (PDB : 6lgw, 7u9g) et VSV G (PDB : 5i2m). Les structures sont alignées sur le FD d'Ikoma G. Les extrémités du FD portant les boucles de fusion sont indiquées en bleu. Le segment 110-117 qui n'avait pas pu être tracé sur MOKV G est en rose et indiqué par une flèche. Ce segment présente une organisation identique à celle observée dans la conformation pré-fusion de RABV G. Le pont disulfure présent à proximité des boucles de fusion chez les Vésiculovirus est indiqué par une flèche noire sur le protomère post-fusion de VSV. **(B)** Organisation des boucles de fusion de l'ectodomaine d'Ikoma G. La structure obtenue présente les motifs <sup>74</sup>GNGS<sup>77</sup> et <sup>121</sup>SS<sup>122</sup>. Pour des questions de représentation, les résidus aromatiques sont représentés (<sup>74</sup>G→F, <sup>77</sup>S→Y, <sup>121</sup>S→W). **(C)** Le domaine PHD d'Ikoma G est présenté à gauche, et il est aligné sur les PHD des autres LYSV G présentées en A. **(D)** Comparaison de l'organisation des régions R4, TrD et du segment C terminal R5 de Ikoma G avec des conformations pré-fusion, d'intermédiaire tardif (LI) et post-fusion de LYSV G. Le pont disulfure présent dans le TrD des LYSV G est indiqué par une flèche noire. Le segment R4, indiqué par une flèche bleue, et le segment R5, indiqué par une flèche violette, sont repliés en hélice chez Ikoma G. **(E)** Le segment R5 des conformations post-fusion de LYSV G est maintenu à proximité du FD grâce au verrou H397-D143-Y145 chez les LYSV G (H407-D137-Y139 chez VSV G) et le verrou H284-D275.



## C. Résidus impliqués dans la transition structurale de Ikoma G

Préalablement à ce travail, la résolution des structures des intermédiaires précoces et tardifs de RABV G a permis d'identifier quatre résidus conservés importants pour le processus de fusion médié par G : D211 et H261 se retrouvent à proximité de E269 et D266 suite au repliement du segment C terminal (R5) à la fin du processus de fusion au sein d'un même protomère de G (Yang et al., 2020) (**Figure 59.A**). Une analyse par mutagenèse de ces résidus a confirmé leur rôle indispensable au processus de fusion (Yang et al., 2020). Dans la conformation post-fusion d'Ikoma G, ces résidus sont également localisés au voisinage les uns des autres et interagissent entre eux (**Figure 59.B**), permettant de stabiliser le segment R4 à proximité du PHD à la fin du processus de fusion membranaire au sein d'un même protomère de Ikoma G (**Figure 59.B**).



**Figure 59. Comparaison de la localisation des résidus permettant la stabilisation de G dans sa conformation post-fusion**

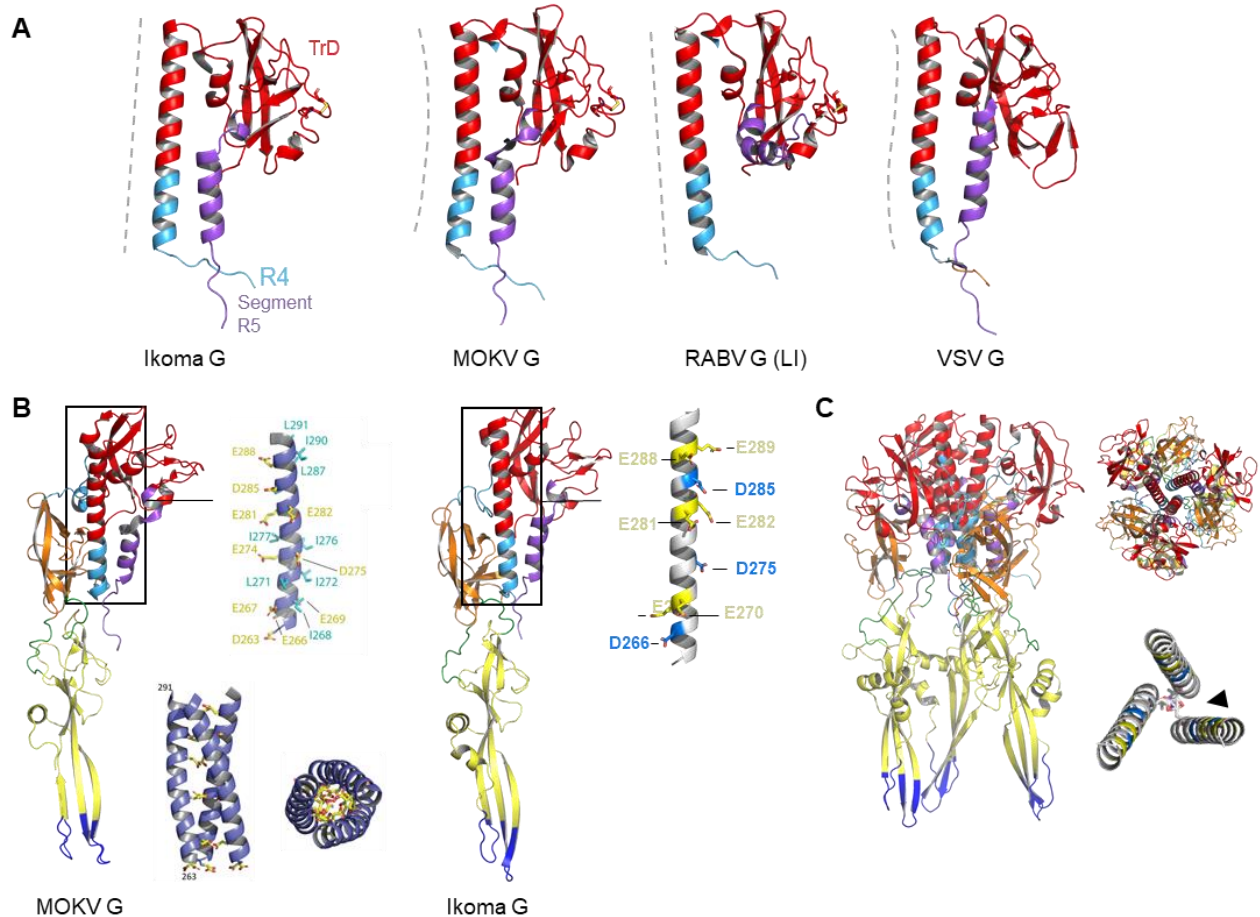
**(A)** Localisation des résidus D211, D266, E269 et H261 sur l'intermédiaire tardif de RABV G (Yang et al., 2020), qui se retrouvent à proximité suite au repliement du segment C terminal (R5) de l'ectodomaine de G (indiqué *qC linker* sur la figure) et qui permettraient de stabiliser chaque protomère de G dans sa conformation post-fusion. (Extrait de Yang et al., 2020) **(B)** Localisation de ces mêmes résidus sur la structure post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub>\*, qui se retrouvent en contact et permettent de stabiliser le segment C terminal replié en hélice à proximité du PHD.

Ensuite, la résolution de la structure du protomère post-fusion de MOKV G a mis en évidence la courbure de l'hélice centrale du domaine TrD, ce qui n'est pas le cas chez les Vésiculovirus (Belot et al., 2019) (**Figure 60.A**). Ce résultat indiquerait que le motif de trimérisation de MOKV G pourrait être de type *coiled-coil* à la différence du faisceau d'hélices droit observé chez les glycoprotéines du genre Vésiculovirus (Belot et al., 2020, Roche et al., 2006, Baquero et al., 2015). Cependant, cette caractéristique ne semble pas s'étendre à toutes les LYSV G. En effet, l'hélice centrale du TrD du protomère post-fusion de Ikoma G et de l'intermédiaire tardif de RABV G sont droites (**Figure 60.A**).



Le motif de trimérisation de RABV G et Ikoma G à pH acide est probablement similaire au faisceau d'hélice caractéristique des glycoprotéines du genre *Vésiculovirus* (**Figure 60.A**).

Un ensemble de résidus acides ont été identifiés comme potentiels interrupteurs sensibles au pH chez MOKV G, qui sont pour la plupart conservés au sein du genre *Lyssavirus* (**Annexe 2**) (Belot et al., 2020). Un ensemble similaire de résidus acides est retrouvé sur l'hélice centrale de Ikoma G (**Figure 60.C**) : D266, E269, E270, D275, E281, E282, D285, E288, E289. En particulier, dans le cas de Ikoma G, les résidus E282, E275 et E289 sont alignés le long de la même face de l'hélice, de même que E281 et E288 (**Figure 60.C**). Il est donc pertinent de chercher à modéliser le trimère post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub> afin d'identifier spécifiquement les résidus qui pourraient interagir avec les protomères voisins au sein du domaine de trimérisation. Pour se faire, plusieurs stratégies de modélisation ont été explorées. Dans un premier temps, le trimère post-fusion de Ikoma G est modélisé dans un premier temps par superposition du TrD, et en particulier de son l'hélice centrale (résidus 262-293), de Ikoma G avec un motif *coiled-coil* (GCNt, Harbury et al., 1993, Yin et al., 2006, Belot et al., 2020) (**Figure 60.C**). Aucune de ces superpositions ne permet de modéliser une conformation trimérique valide : les clashes stériques sont trop importants (**Figure 60.C**). Néanmoins, le motif de trimérisation à bas pH d'Ikoma G semble correspondre davantage à un motif de type faisceau d'hélices droites.



**Figure 60. Comparaison du motif de trimérisation de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* et MOKV G<sub>1-440</sub>\* à pH acide**

**(A)** A la différence de ce qui est observé chez MOKV G dans sa conformation post-fusion, l'hélice centrale du TrD de Ikoma G est droite. Les hélices de l'intermédiaire tardif de RABV, ainsi que de la conformation post-fusion de VSV sont également présentées (PDB : 6tmr, 6lgw, 5i2m). Les lignes en pointillés représentent la courbure de l'hélice. **(B)** Comparaison des résidus acides (jaunes) et hydrophobes (bleus) présents le long de cette hélice centrale sur Ikoma G (gauche) et MOKV G (droite) (Belot et al., 2019). Sur Ikoma G, D275, E282 et E289 sont alignés sur la même face de l'hélice. **(C)** Modélisation du trimère post-fusion de Ikoma G par superposition à un motif *coiled-coil* GNTC (Yin et al., 2006).

Dans un deuxième temps, le trimère post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* a été modélisé avec le logiciel AlphaFold2 (Jumper et al., 2021) (**Figure 61**). L'étude des résidus impliqués dans les contacts latéraux entre les protomères de Ikoma G<sub>1-400</sub> fait ressortir trois zones d'interactions entre les protomères (**Figure 61.A**) : une zone d'interaction entre le haut de l'hélice du TrD et la tête globulaire du TrD voisin (zone 1, **Figure 61.A**), une zone d'interaction latérale entre les deux têtes globulaires de deux TrD voisins (zone 2, **Figure 61.A**), et une troisième zone d'interaction entre les hélices du segment R4 mettant en jeu l'interaction entre R275 et S272 du protomère voisin (zone 3, **Figure 61.A**). Les résidus impliqués dans les interactions entre les protomères au sein des clusters identifiés varient d'une modélisation à l'autre. Afin de confirmer un peu plus les zones d'interaction et les résidus identifiés, le trimère post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub> est construit par superposition au modèle AlphaFold2 le plus

similaire (**Table 5, Figure 61.B&C**). Les domaines TrD-R4, PHD et FD sont ainsi alignés sur ceux du modèle sélectionné. A noter que le positionnement du TrD est optimal seulement lorsque celui-ci est aligné sur l'hélice centrale TrD-R4 (**Figure 61.D&E**). Au sein du trimère modélisé, trois zones d'interaction entre les protomères de Ikoma G sont identifiées (*clusters*, **Figure 61.F**). Les clusters 1, 2 et 3 font intervenir des résidus acides (D et E) localisés à proximité au sein du trimère post-fusion modélisé de Ikoma G<sub>1-440</sub> qui pourraient jouer le rôle d'interrupteurs sensibles au pH comme décrit chez VSV G (Ferlin et al., 2014). Ces résidus sont effectivement déprotonés à pH acide et leur déprotonation suite à l'augmentation du pH pourrait induire des forces répulsives et initier le changement de conformation réverse de la conformation post-fusion vers la conformation pré-fusion (Ferlin et al., 2014). D'autre part, l'histidine H384 a également été identifiée comme participant à la stabilisation du trimère post-fusion de Ikoma G. Les histidines sont des résidus qui ont été proposés comme interrupteurs sensibles au pH qui permettent la transition de la conformation pré-fusion vers la conformation post-fusion de G (Roche et al., 2007, Carneiro et al., 2003), et leur rôle a été confirmé chez VSV G (Beilstein et al., 2020) (voir **Introduction.II-C.4**). Ces résultats étant issus d'une modélisation, il est d'autant plus nécessaire de valider leur rôle dans le processus de fusion médié par G par mutagenèse couplée à des tests de fusion cellule-cellule (Beilstein et al., 2020, Ferlin et al., 2014). Si des résidus sont effectivement identifiés comme importants au changement de conformation de Ikoma G, il serait intéressant d'identifier des mutations compensatoires qui permettraient d'approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la transition de Ikoma G.

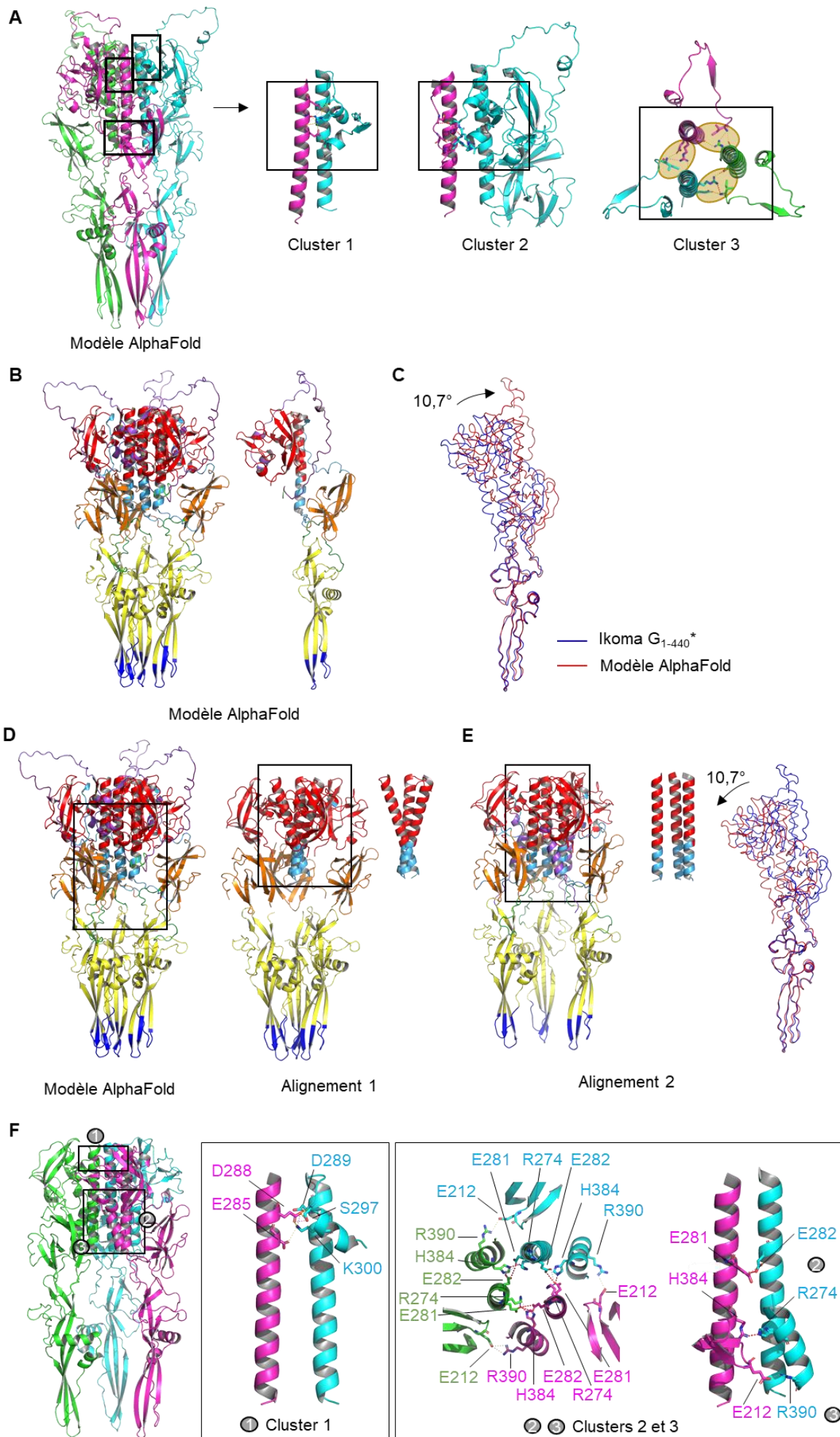
**Table 5. Comparaison des modèles de trimères post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub> générés par AlphaFold2 et la structure cristallographique du protomère Ikoma G<sub>1-440</sub>\***

La valeur RMSD et le nombre de carbones  $\alpha$  superposables sont indiqués pour chacun des trois domaines et correspondent à la comparaison du trimère de G modélisé contre la structure cristallographique de Ikoma G<sub>1-440</sub>\*.

Domaine structural	Nombre de résidus	Modèle 1 / Ikoma G <sub>1-440</sub> *	Modèle 2 / Ikoma G <sub>1-440</sub> *	Modèle 3 / Ikoma G <sub>1-440</sub> *	Modèle 4 / Ikoma G <sub>1-440</sub> *	Modèle 5 / Ikoma G <sub>1-440</sub> *
FD	128 (53-181)	0,835 (119 C $\alpha$ )	0,825 (116 C $\alpha$ )	0,759 (117 C $\alpha$ )	0,759 (115 C $\alpha$ )	0,754 (115 C $\alpha$ )
PHD	72 (37-46 et 91-254)	0,579 (69 C $\alpha$ )	0,646 (73 C $\alpha$ )	0,559 (69 C $\alpha$ )	0,619 (70 C $\alpha$ )	0,554 (68 C $\alpha$ )
TrD	121 (1-21 et 273-374)	0,734 (91 C $\alpha$ )	0,723 (90 C $\alpha$ )	0,776 (91 C $\alpha$ )	0,776 (91 C $\alpha$ )	0,825 (91 C $\alpha$ )
<b>Protomère</b>	398	2,534 (369 C $\alpha$ )	2,649 (366 C $\alpha$ )	3,180 (371 C $\alpha$ )	3,559 (375 C $\alpha$ )	3,451 (374 C $\alpha$ )

**Figure 61. Modélisation du trimère post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub> par AlphaFold2**

**(A)** Identification de trois régions d'interaction entre les protomères post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub> sur les différents modèles proposés par AlphaFold. Chaque protomère est représenté dans une couleur différente. Pour des raisons de représentations, seules les régions d'interaction entre deux protomères sont indiquées pour les clusters 1 et 2. **(B)** Modèle AlphaFold2 choisi pour la reconstruction du trimère post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub> (trimère à gauche, protomère à droite). **(C)** Superposition des protomères post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub> résolue (bleu) et modélisée (rouge). **(D)** Résultat de la superposition des domaines TrD, PHD et FD de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* sur le trimère modélisé de Ikoma G. Lorsque le domaine TrD est superposé dans sa globalité au TrD modélisé, les hélices centrales du TrD présentent un clash important. **(E)** Résultat de la superposition de l'hélice centrale du TrD de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* avec celle du modèle AlphaFold. Les hélices centrales du TrD sont correctement positionnées les unes par rapport aux autres. **(F)** Résidus impliqués dans les contacts latéraux entre les protomères de Ikoma G au sein du trimère post-fusion modélisé. Trois clusters sont identifiés. Le cluster 1 met en jeu des résidus localisés dans le haut de l'hélice  $\alpha$  centrale du TrD et stabilisent ces hélices entre elles. Le cluster 2 fait intervenir des résidus localisés dans le bas de l'hélice centrale  $\alpha$  du TrD et l'hélice du segment C terminal du protomère voisin et stabilisent les deux domaines entre eux. Les résidus du cluster 3 sont portés par l'hélice centrale du TrD et le domaine PHD du protomère voisin et stabilisent ces deux domaines l'un par rapport à l'autre.

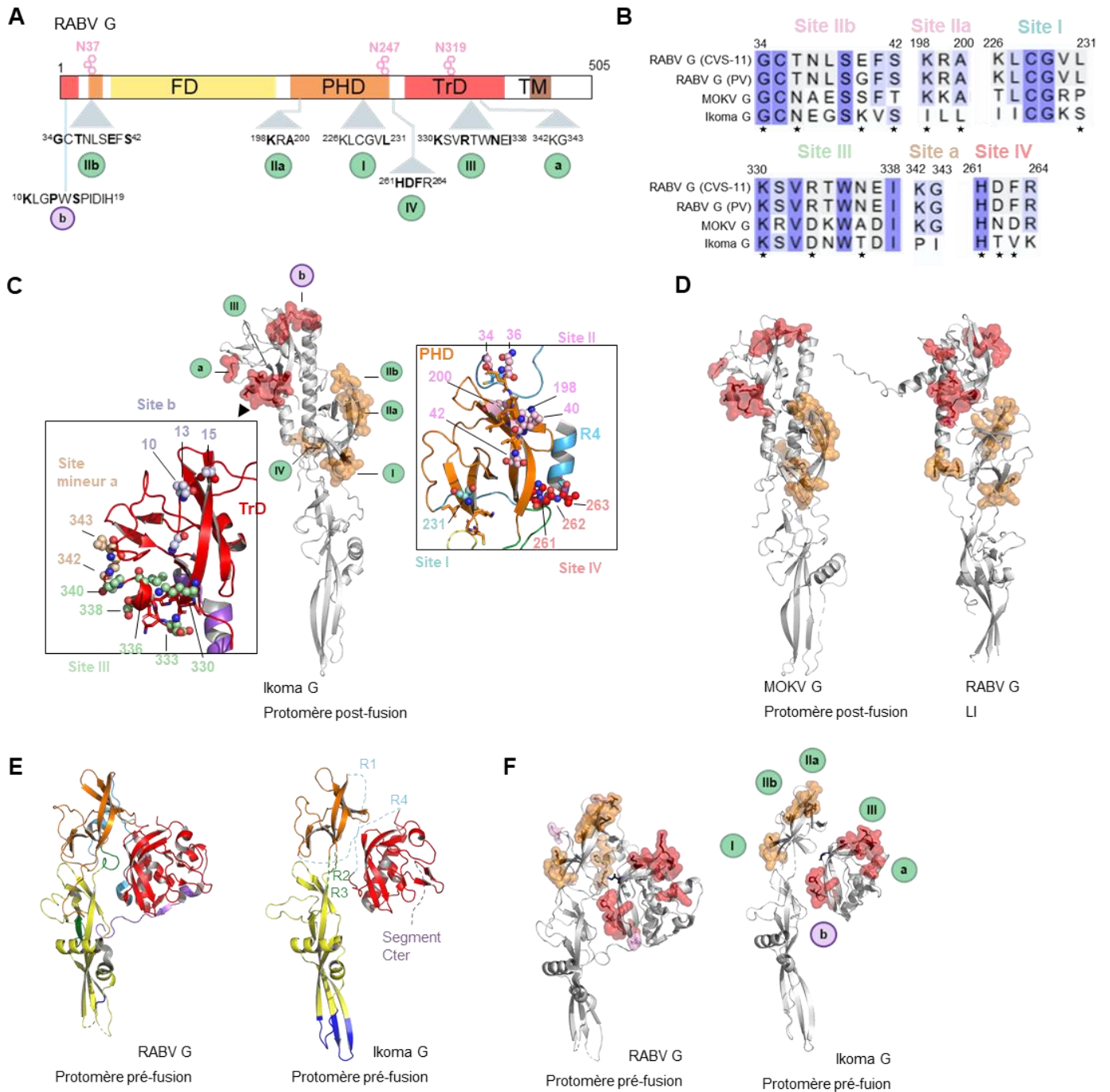


## **D. Antigénicité de Ikoma G<sub>1-440</sub>**

Pour rappel, quatre sites antigéniques majeurs, I, IIa et IIb, III, IV, et un site mineur, a, ont été identifiés chez RABV G (**Introduction.III-B.2**). Ces sites ont été replacés sur la structure du protomère post-fusion de Ikoma G par alignement de séquence (48% d'identité en séquence d'acide aminés, voir **Table 4** pour la conservation structurale des différents domaines de G) (**Figure 62.A-C**).

L'organisation des domaines structuraux étant assez bien conservée entre les différentes structures résolues de LYSV G (**Table 4, Figure 58**), la structure 3D des sites antigéniques identifiés sur RABV G est par conséquent assez conservée chez Ikoma G (**Figure 62.C&D**). Pour comparaison, le protomère post-fusion de MOKV G et l'intermédiaire tardif de RABV (LI) sont présentés à côté du protomère post-fusion d'Ikoma G en **Figure 62.C&D**. Le domaine PHD, qui contient les sites antigéniques I, II et IV, et le domaine TrD, qui porte le site antigénique III, sont extrêmement conservés dans leur structure entre les différents phylogroupes (**Figure 62.C&D, Figure 58**).

Sur le protomère pré-fusion de Ikoma G, modélisé par alignement de chacun des domaines structuraux sur ceux de RABV G dans sa conformation pré-fusion (PDB : 7u9g), les sites antigéniques II et III, portés respectivement par le PHD et le TrD, sont les plus exposés à l'environnement extérieur (**Figure 62.E&F**). La faible conservation au niveau de leur séquence en acides aminés (comparée au reste de la séquence de G) des domaines TrD et PHD, et donc des sites antigéniques II et III, indique encore une fois que la réponse humorale est à l'origine de la diversification de l'architecture des glycoprotéines de Rhabdovirus (Belot et al., 2020). Le domaine de fusion, FD, lui, est moins accessible aux anticorps lorsque G est ancrée à la surface des particules virales, et ne comporte pas de site antigénique identifié à ce jour.



**Figure 62. Sites antigéniques de RABV G positionnés sur l'ectodomaine de Ikoma G**

**(A)** Présentation des sites antigéniques de RABV G (PDB : 7u9g). 4 sites majeurs (I, IIa&b, III et IV) et un site mineur (a) sont les principaux sites antigéniques de RABV G. Un épitope de neutralisation à pH acide est également identifié (b). **(B)** Conservation des sites antigéniques au sein des LYSV G. Les résidus clés identifiés chez RABV G (souche CVS-11) sont indiqués par une étoile. La souche PV correspond à la souche vaccinale Pasteur. Si les sites antigéniques sont assez conservés au sein du phylogroupe I, ils ne le sont pas avec Ikoma G. **(C)** Localisation des sites antigéniques présentés sur le protomère post-fusion de Ikoma G. Les chaînes latérales des résidus qui constituent le site sont visibles, celles des résidus clés sont indiquées. **(D)** Comparaison de la localisation des sites antigéniques sur le protomère post-fusion de MOKV G et l'intermédiaire tardif (LI) de RABV G (PDB : 6tmm, 6lgw). **(E)** Modèle du protomère pré-fusion de Ikoma G (droite) généré par superposition des domaines TrD, PHD et FD au protomère pré-fusion de RABV G (PDB : 7u9g). **(F)** Localisation des sites antigéniques sur le protomère pré-fusion modélisé de Ikoma G.

Il a été montré que les anticorps produits par la vaccination contre RABV et les immunoglobulines anti-rabiques actuelles ne protègent pas contre les infections par des Lyssavirus des phylogroupes II et III (Bradane et al., 2001, Horton et al., 2014, Ertl HCJ, 2019, de Melo et al., 2022). Les sérums protégeant contre LBV présentent une neutralisation intra-phylogroupe II importante mais très partielle contre les autres phylogroupes (Evans et al., 2018) et le sérum issu de chauve-souris insectivores porteuses de WCBV ne neutralise aucun autre Lyssavirus, à l'exception de DUVV (Kuzmin et al., 2008).

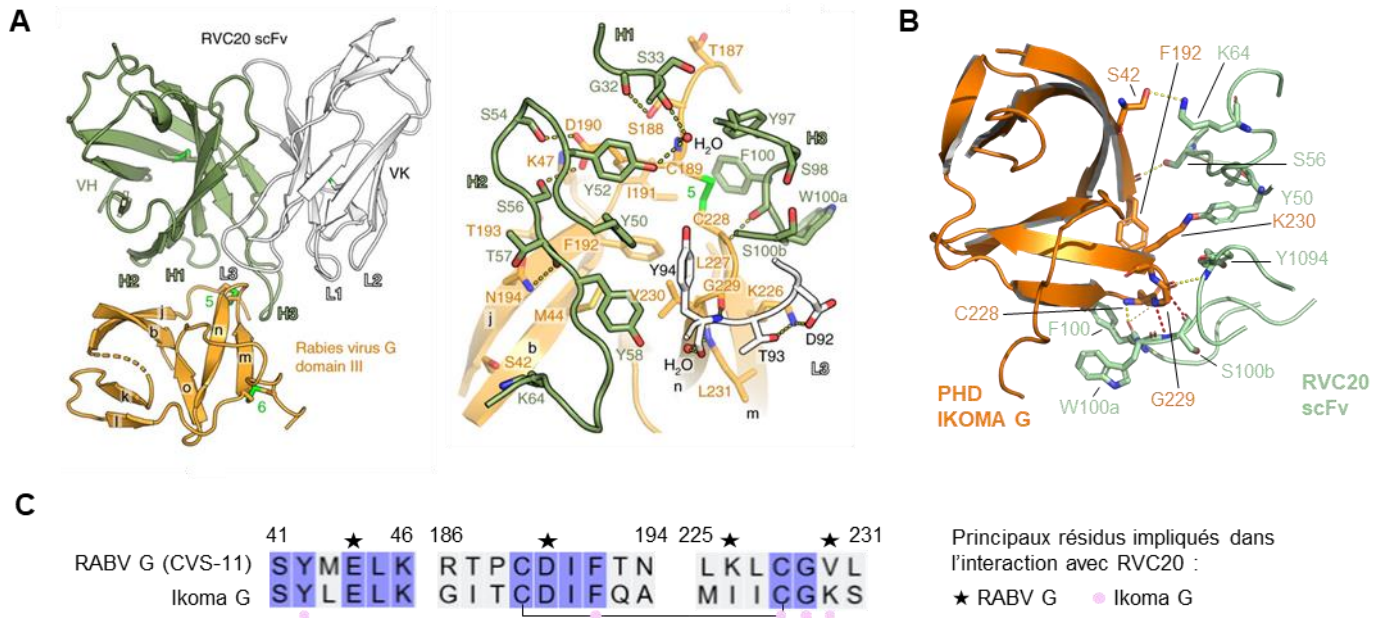
Cette absence de neutralisation inter-phylogroupe a conduit à l'étude du rôle des différents épitopes de neutralisation dans ces phénomènes d'immunodominance (i.e. phénomène dans lequel les réponses immunitaires sont excessivement dirigées contre quelques épitopes antigéniques au détriment du plus grand nombre) (Evans et al., 2018). Des expériences d'échange de sites de neutralisation entre LBV et RABV ont montré que la neutralisation des Lyssavirus du phylogroupe I dépend d'avantage des sites antigéniques I et III, tandis que la neutralisation des Lyssavirus du phylogroupe III dépendrait, elle, d'avantage d'anticorps neutralisants ciblant le site antigénique II (Evans et al., 2018).

Plusieurs structures de RABV G en complexe avec des anticorps neutralisants ont été résolues récemment (Hellert et al., 2020, Yang et al., 2020, Callaway et al., 2022, Ng et al., 2022).

En particulier, Hellert et al. ont résolu la structure du PHD de RABV G en complexe avec le mAb RVC20. Ce mAb est issu d'un criblage d'anticorps monoclonaux chez quatre individus vaccinés (De Benedictis et al., 2016). RVC20 est particulièrement intéressant pour deux raisons : (1) c'est le seul anticorps monoclonal connu à ce jour qui présente une activité de neutralisation à large spectre contre les LYSV G du phylogroupe I, mais aussi contre SHIBV du phylogroupe II et le virus Ikoma (De Benedictis et al., 2016) ; (2) l'injection simultanée par voie intracérébroventriculaire et intramusculaire du cocktail de mAbs RVC20 et RVC58, un autre mAb neutralisant ciblant le site antigénique III de RABV G (De Benedictis et al., 2016), a permis la guérison de souris infectées par RABV qui présentaient déjà des signes cliniques, amenant la preuve de concept de la possibilité d'un traitement de rage symptomatique, ce qui était jugé impossible jusque-là (De Melo et al., 2020). RVC20 cible le site antigénique I chez RABV G (**Figure 63.A**) (Hellert et al., 2020). Le complexe Ikoma G – RVC20 est modélisé par alignement du PHD de Ikoma G avec le PHD de RABV de la structure résolue par Hellert et al., 2020 (**Figure 63.B**). Si les résidus impliqués dans l'interaction entre Ikoma G et RVC20 sont différents de ceux identifiés pour RABV G, ces résidus sont néanmoins conservés entre les deux LYSV (**Figure 56, Figure 63.C**). Il a aussi été montré que le mutant RABV G V230K ne diminue que peu l'efficacité de neutralisation de RABV G par RVC20 (Hellert et al., 2020). Les résultats de cette modélisation expliquent en partie le caractère pan-neutralisant de RVC20. Néanmoins, cela mériterait



une étude plus approfondie, notamment la confirmation de l'implication des résidus identifiés dans l'interaction avec RVC20, et dans le meilleur des cas la résolution de la structure du complexe Ikoma G – RVC20.



**Figure 63. Modélisation du complexe RVC20 – Ikoma G**

**(A)** Structure du complexe résolu entre le domaine PHD de RABV G et le fragment scFv du mAb RVC20 (Hellert et al., 2020). **(B)** Modélisation du complexe entre le domaine PHD de Ikoma G et du mAb RVC20. Le PDH de Ikoma G se superpose avec un rmsd de 1,29 (50 C $\alpha$ ) à la structure du PHD de RABV résolue par Hellert et al., 2020 (PDB : 6tou). Les résidus impliqués dans le contact entre G et le scFv sont indiqués. **(C)** Alignement des épitopes de RABV G et Ikoma G reconnus par RVC20 : les principaux résidus identifiés sur le PHD de RABV sont indiqués par une étoile noire, ceux sur Ikoma G par un cercle rose. Le pont disulfure entre les cystéines 187 et 228 au niveau du PHD est indiqué.

## **V. Sélection de binders contre l'ectodomaine de Ikoma G<sub>1-440</sub>\***

### **A. De la nécessité de binders contre les LYSV G**

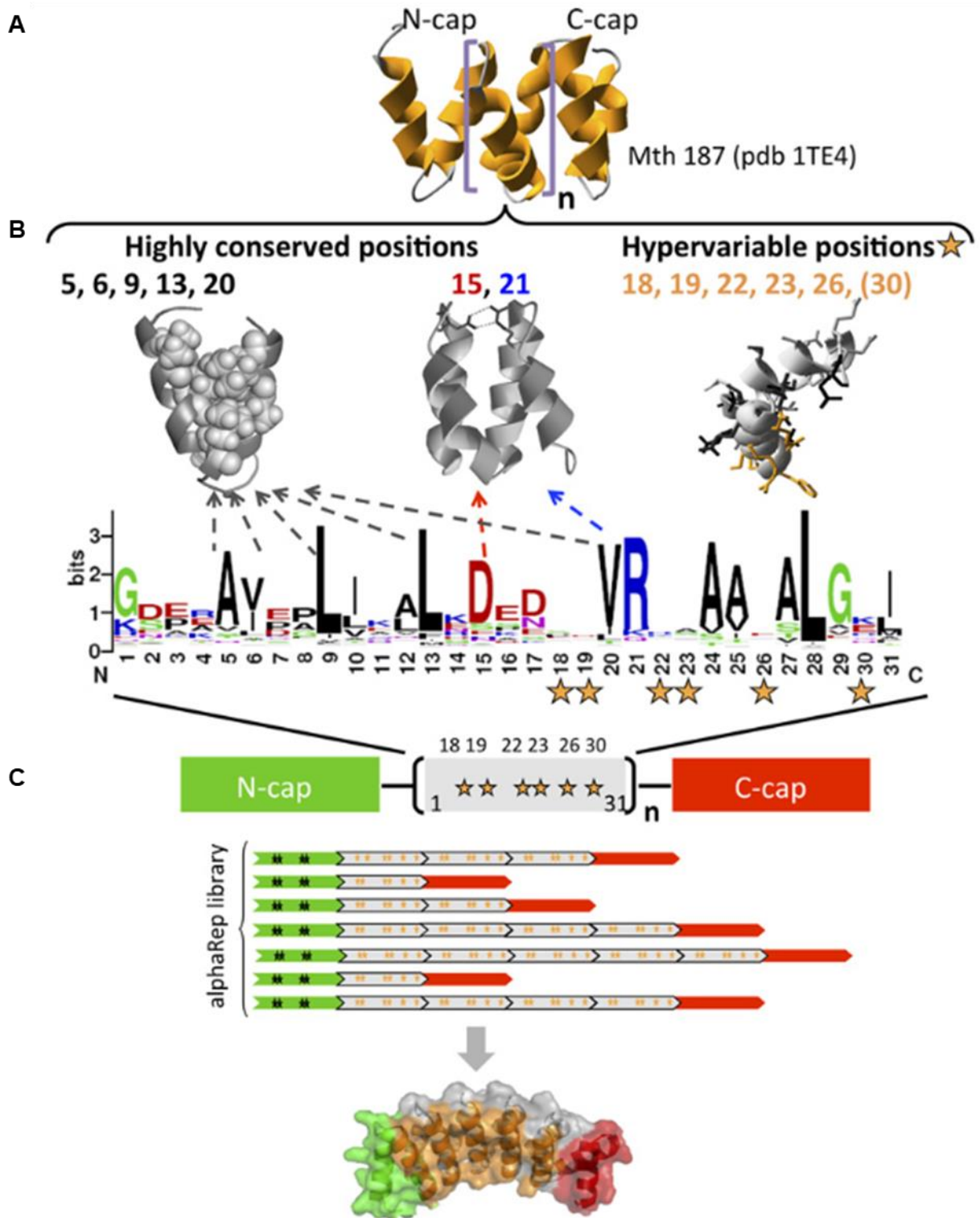
Afin de compléter l'étude structurale menée sur Ikoma G, une approche complémentaire est envisagée (voir **VI. Perspectives**). Cette étude nécessite de disposer de binders spécifiques contre Ikoma G. Or, il n'existe actuellement aucun anticorps commercialisé ni binders disponibles contre les LYSV G hormis RABV G.

C'est dans ce cadre que nous avons pu initier une collaboration avec l'équipe de Philippe Minard et Agathe Urvoas, I2BC, qui a développé une librairie d' $\alpha$ Reps (Urvoas et al. 2010, Urvoas et al. 2012, Valerio-Lepiniec et al. 2015). Les  $\alpha$ Reps sont des protéines thermostables constituées de répétitions  $\alpha$ hélicoïdales de type HEAT d'une longueur de 31 acides aminés (**Figure 64**) (Valerio-Lepiniec et al., 2015). Ces protéines artificielles présentent des séquences dans lesquelles la plupart des positions sont occupées par des acides aminés conservés tandis que certaines positions sont hypervariables, ce qui crée une surface de liaison fortement polyvalente (**Figure 64**). Ces protéines artificielles ont d'autre part l'avantage d'être faciles à produire en système bactérien, en grande quantité, et d'être très stables (Valerio-Lepiniec et al., 2015). La bibliothèque d' $\alpha$ Reps générée par l'équipe de Philippe Minard et Agathe Urvoas s'est révélée être une source d'interactants spécifiques et de haute affinité sur une large gamme de cibles protéiques fortement divergentes et non apparentées (Chevrel et al., 2015, Campanacci et al., 2019, Thébault et al., 2022).

De par leur nature, ces protéines ont un large champ d'applications. Elles peuvent être utilisées en substitution d'anticorps. De plus, les  $\alpha$ Reps ne présentent pas de cystéine dans leur séquence (Valerio-Lepiniec et al., 2015). Il est donc possible d'introduire en N-terminal une cystéine, ce qui permet de greffer une sonde ATTO avec un groupement maléimide par exemple. Les  $\alpha$ Reps peuvent également être exprimées en cellules eucaryotes, en fusion avec d'autres protéines et servir en imagerie cellulaire (Chevrel et al., 2015).

Ces binders artificiels peuvent également aider à la cristallisation de cibles protéiques (Tiouajni et al., 2014, Chevrel et al., 2015, Valerio-Lepiniec et al., 2015) y compris des structures tubulaires (Campanacci et al., 2019) et en cryo-EM.

Enfin, il a été montré que les  $\alpha$ Reps peuvent présenter des propriétés antivirales. Par exemple, des  $\alpha$ Reps ont été sélectionnées contre la nucléocapside du VIH-1 et interfèrent négativement avec la maturation du virus (Hadpech et al., 2017). D'autres encore, ont été sélectionnées contre la spike du SARS-CoV 2 et présentent une forte activité antivirale (Thébault et al., 2022).



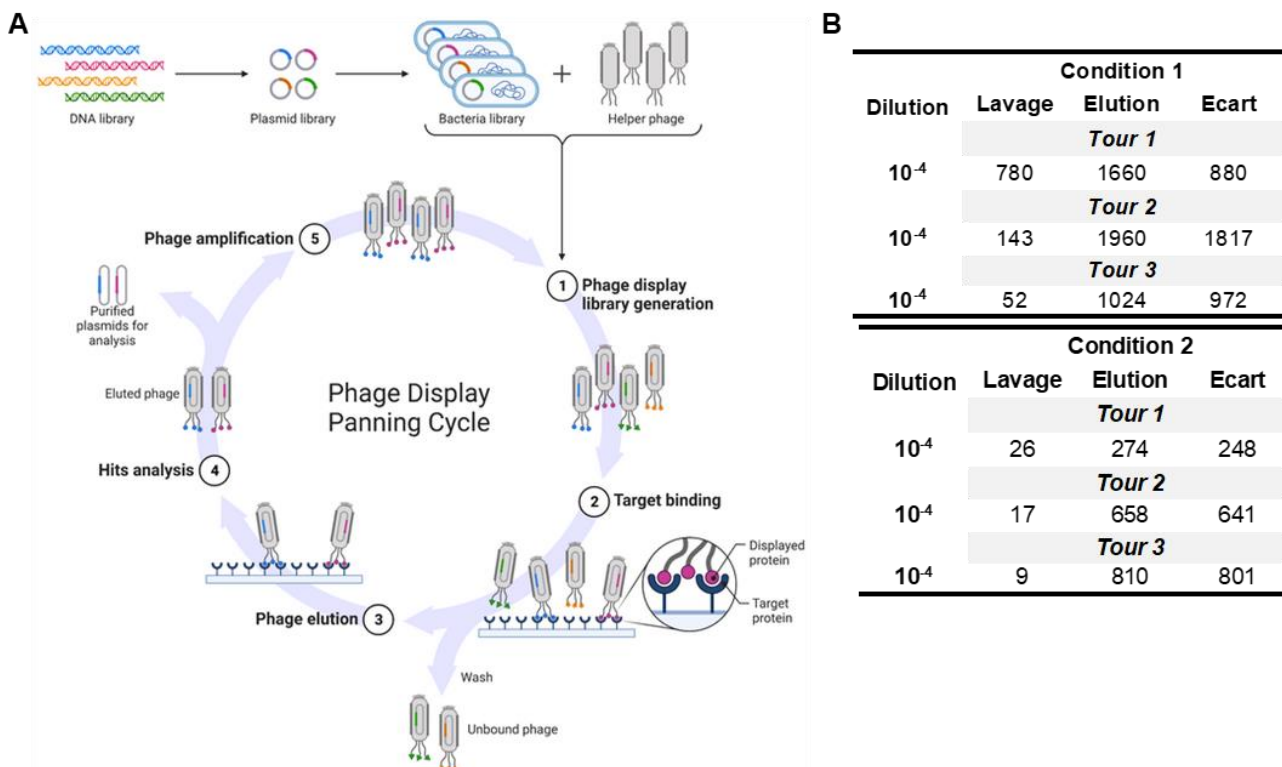
**Figure 64. Organisation d'une  $\alpha$ Rep**

(A) Les  $\alpha$ Reps sont constituées de répétitions  $\alpha$ hélicoïdales de type HEAT, indiquées  $n$  sur le schéma. Elles ont été établies à partir de la structure Mth187. (B) Les alignements de séquence de protéines homologues à Mth187 a permis d'identifier plusieurs positions hypervariables au sein d'une séquence consensus conservée. Ces positions hypervariables sont indiquées par une étoile. Elles sont localisées à la surface de la 2<sup>ème</sup> hélice constituant 1 répétition  $\alpha$ hélicoïdale de type HEAT. (C) Au sein de la librairie, les gènes codant les  $\alpha$ Reps codent un module de répétition compris entre deux modules externes (N- et C-cap). La structure d'une des  $\alpha$ Reps est représentée en dessous ( $n=3$ ). (Extrait de Valerio-Lepiniec et al., 2015).

## B. Sélection d' $\alpha$ Reps dirigées contre Ikoma G<sub>1-440</sub>\*

Le screen d' $\alpha$ Reps dirigés contre Ikoma G a été réalisé sur la banque 2.1 de l'équipe de Philippe Minard et Agathe Urvoas (Urvoas et al. 2010, Urvoas et al. 2012, Valerio-Lepiniec et al. 2015) par phage display, comme décrit dans Hadpech et al., 2017, avec des modifications mineures, sur trois cycles de sélection (**Figure 65.A**).

La banque naïve, qui correspond à la diversité d' $\alpha$ Reps au début de la sélection, contient  $\sim 1,7 \cdot 10^9$  clones indépendants. Deux sélections ont été faites en parallèle, à pH 7,5 : une pour laquelle la cible Ikoma G<sub>1-440</sub>\* 6His (présentant un tag 6His) est immobilisée soit sur une plaque ELISA 96 puits pré-recouverte de Ni<sup>++</sup>-NTA-biotine streptavidine (condition 1), soit directement par adsorption sur une plaque 96 puits (condition 2). A chaque tour de sélection, le nombre d' $\alpha$ Reps spécifiques (élués) est comparé au nombre d' $\alpha$ Reps non spécifiques (décrochées par rinçage après incubation avec la cible) (**Figure 65.B**). L'étape finale de phage ELISA nous a permis d'identifier 11 clones indépendants (**Table 6**). Sur ces 11  $\alpha$ Reps identifiées, 6 sont sélectionnées pour la suite de l'étude, sur des critères de taille et de redondance dans le criblage ELISA (**Table 6**).



**Figure 65. Sélection par phage display d' $\alpha$ Reps dirigées contre Ikoma G<sub>1-440</sub>\***

**(A)** Le cycle de sélection des  $\alpha$ Reps par phage display est présenté. 3 cycles de sélections sont effectués ici. **(B)** Le nombre de phages sélectionnés à chaque tour est indiqué dans les tableaux. La condition 1 correspond à la sélection faite contre Ikoma G<sub>1-440</sub>\* 6His, la condition 2 correspond à la sélection faire contre Ikoma G<sub>1-440</sub>\* StrepTag II. L'écart entre l'élué et le lavage est indiqué pour chaque tour.

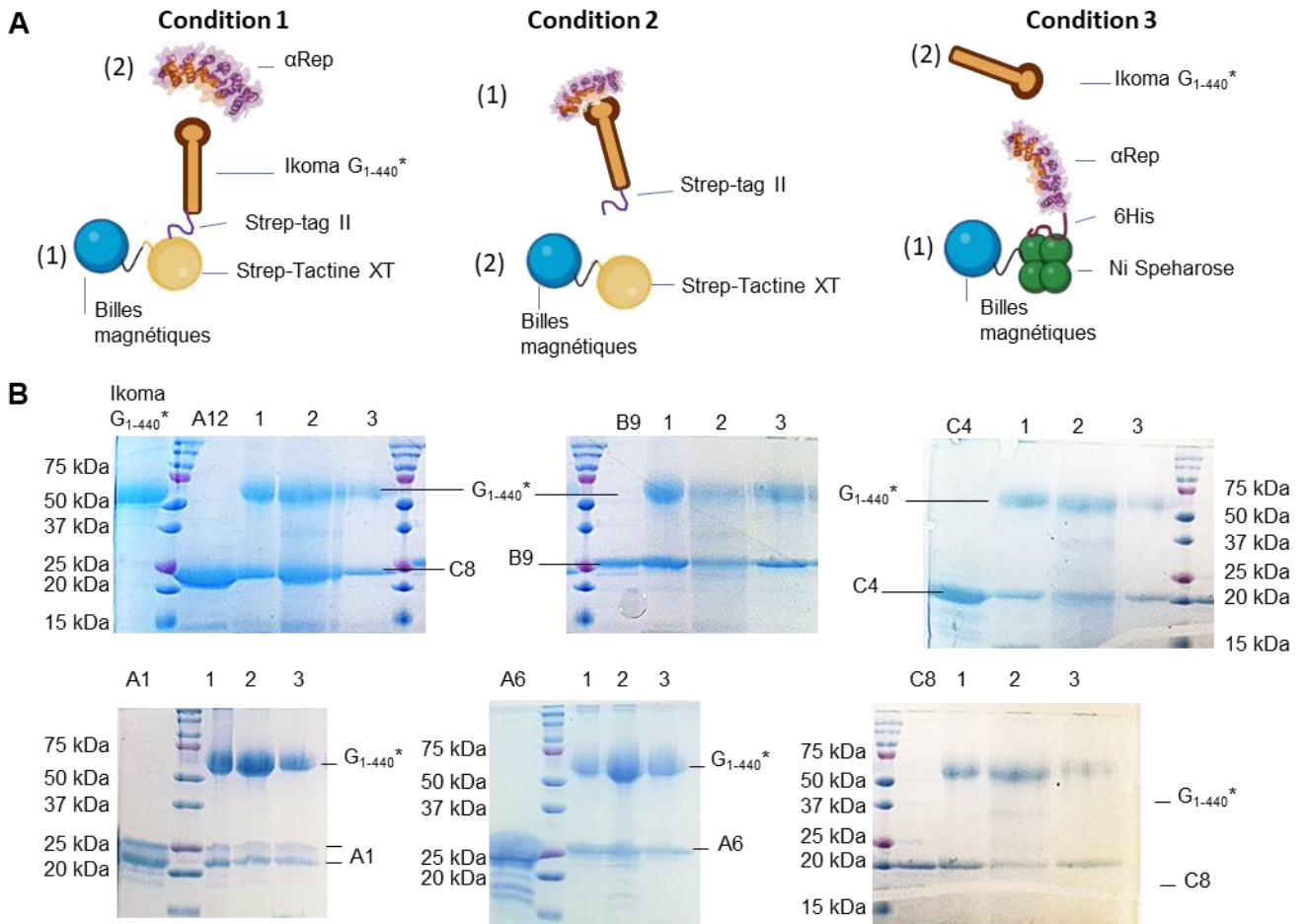
**Table 6.  $\alpha$ Reps sélectionnées contre Ikoma G<sub>1-440</sub>\* à l'issu du criblage par phage ELISA**

Les 6  $\alpha$ Reps sélectionnées sont en gras sur fond gris dans le tableau. Le nombre de répétitions internes de chaque  $\alpha$ Rep ( $n$  sur la **Figure 64**) est indiqué. Plus une  $\alpha$ Rep présente de répétition, plus sa taille est importante. La cible avec laquelle l' $\alpha$ Rep interagit au cours de l'ELISA est indiquée : il s'agit de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* possédant un tag StrepTag II ou 6His. La redondance dans le criblage des  $\alpha$ Reps indique le nombre de fois où le clone a été identifié par séquençage dans des puits différents.

$\alpha$ Rep	Nombre de répétitions internes $n$	Poids moléculaire (Kda)	Cible	Redondance dans le criblage
B4	0		Ikoma G <sub>1-440</sub> * strepTag II	1
A3	0		Ikoma G <sub>1-440</sub> * strepTag II	1
<b>C4</b>	4	21,1	Ikoma G <sub>1-440</sub> * strepTag II	7
<b>A12</b>	5	24,6	Ikoma G <sub>1-440</sub> * strepTag II & 6His	7
<b>A1</b>	5	20,4	Ikoma G <sub>1-440</sub> * strepTag II & 6His	3
G3	5		Ikoma G <sub>1-440</sub> * strepTag II	1
<b>C8</b>	6	27,9	Ikoma G <sub>1-440</sub> * 6His	5
E7	6		Ikoma G <sub>1-440</sub> * 6His	2
A11	6		Ikoma G <sub>1-440</sub> * 6His	1
<b>B9</b>	6	28,2	Ikoma G <sub>1-440</sub> * 6His	1
<b>A6</b>	7	30,9	Ikoma G <sub>1-440</sub> * 6His	1

### C. Tests d'interaction entre les $\alpha$ Reps sélectionnées et Ikoma G<sub>1-440</sub>\*

Dans un premier temps, l'interaction entre G<sub>1-440</sub>\* et les 6  $\alpha$ Reps sélectionnées est confirmée par *pull down* à pH 7,5 (**Figure 66**). Pour cela, deux conditions sont testées. Soit Ikoma G<sub>1-440</sub>\* avec l'étiquette StrepTag II est préalablement immobilisée sur billes magnétiques streptactine XT (MagStrep® Strep-Tactin®XT) soit les  $\alpha$ Reps possédant un tag 6His sont pré-incubées en présence de billes magnétiques Ni-NTA (Ni-NTA Magnetic Beads, NEB). Après rinçage, les  $\alpha$ Reps et Ikoma G<sub>1-440</sub>\* sont respectivement ajoutés et l'ensemble est incubé 1h à RT. Après rinçage, la présence de la cible et des  $\alpha$ Reps est évaluée par SDS-PAGE (**Figure 66**). Ces expériences de *pull-down* ont montré que les 6  $\alpha$ Reps sélectionnées sont toutes capables d'interagir avec leur cible à pH7,5 (**Figure 66**). Il est prévu par la suite d'évaluer la capacité de ces  $\alpha$ Reps à interagir avec Ikoma G<sub>1-440</sub>\* à différents pH. Cela pourrait nous aider par la suite à piéger d'autres conformations de G par cristallographie.



**Figure 66. Test d'interaction par pull-down des αReps sélectionnés contre Ikoma G<sub>1-440</sub>\***

**(A)** Présentation des conditions de pull-down. Dans les conditions 1 et 3, les cibles sont d'abord immobilisées sur les billes magnétiques, et le partenaire est ensuite présenté. Dans la condition 2, Ikoma G<sub>1-440</sub>\* est d'abord incubé en présence des αReps puis incubé en présence de billes magnétiques anti-StrepTag II. **(B, C et D)** Gels SDS-PAGE mettant en évidence l'interaction entre Ikoma G<sub>1-440</sub>\* et les αReps sélectionnés.

La caractérisation biophysique de ces αReps n'a pas encore été réalisée. Nous allons notamment étudier de la stabilité de ces binders par fluorimétrie différentielle à balayage micro-échelle (nano-DSF). D'autre part, en fonction des séquences, les αReps peuvent s'oligomériser. La spectrométrie de masse par diffusion interférométrique pourra nous donner une première information sur l'état d'oligomérisation des binders seuls et en présence de la cible Ikoma G<sub>1-440</sub>\* (Young et al., 2018). Cette technique permet de mettre en relation la taille de la particule avec l'intensité de la diffusion de la lumière lors de son contact avec une surface en verre en mesurant des événements ponctuels (Young et al., 2018). Cette approche serait à compléter avec une analyse par SEC-MALS, beaucoup plus précise dans la détermination de la masse molaire absolue de l'échantillon ainsi que du rayon de giration (Rg) moyen des molécules constitutives de l'échantillon.

Ensuite, il conviendra de mesurer l'affinité, et éventuellement la cinétique d'attachement, de chaque  $\alpha$ Reps pour Ikoma G<sub>1-440</sub>\*. Comme pour l'étude du complexe VSV G – FAB, cette étude sera menée par *bio-layer interferometry* (BLI). De façon similaire aux tests de *binning* d'épitopes (immuno-essai compétitif permettant de caractériser puis trier une banque d'anticorps par exemple) couramment utilisée dans le développement vaccinal (Petersen et al., 2017), il serait intéressant de réaliser des tests de compétitions croisées afin d'identifier éventuellement des  $\alpha$ Reps reconnaissant des épitopes identiques ou proches sur Ikoma G<sub>1-440</sub>\* contre des  $\alpha$ Reps (Petersen et al., 2017). Ces mesures seraient à mener à différents pH, en fonction des résultats obtenus à l'issue des *pull-down* réalisés à pH acide et pH intermédiaires.

Suite à la caractérisation bio-physique des complexes Ikoma G<sub>1-440</sub>\* -  $\alpha$ Reps, les complexes les plus intéressants (rendement de production, état d'oligomérisation,  $K_d$  mesuré, compétition pour un même épitope, taille de l' $\alpha$ Rep) seront purifiés. Des essais de cristallisation seront menés (Chevrel et al., 2018, Valerio-Lepiniec et al., 2015). Si la taille du/des complexes purifiés le permet, une étude par cryo-EM sera menée (Ikoma G<sub>1-440</sub>\*: 53,6kDa ; 20,4kDa <  $\alpha$ Reps < 28,2kDa). Actuellement, il est admis qu'en dessous de ~100 kDa, la résolution des structures étudiées reste limitée en cryo-EM, bien que des progrès rapides et nombreux soient en cours et permettent une résolution satisfaisante de complexes ~50 kDa (Lander et Glaeser, 2021, Wentinck et al., 2022). Cela permettrait d'avoir accès, éventuellement, à la structure pré-fusion de Ikoma G.

## VI. Conclusions et perspectives

La résolution de la structure du protomère post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* a permis de confirmer la conservation de l'architecture des LYSV G entre les phylogroupes les plus divergents. Le domaine PHD, qui contient les sites antigéniques I, II et IV, et le domaine TrD, qui porte le site antigénique III, sont extrêmement conservés entre les différents phylogroupes (**Figure 56**). De ce fait, leur faible conservation au niveau de leur séquence en acide aminés (comparée au reste de la séquence de G) indique encore une fois que la réponse humorale est à l'origine de la diversification de l'architecture des glycoprotéines Rhabdovirus. Le domaine de fusion, FD, lui, est moins accessible aux anticorps lorsque G forme une couche à la surface des particules virales, et ne comporte pas de site antigénique identifié à ce jour. La structure résolue de l'ectodomaine de Ikoma G permet également d'améliorer notre compréhension de la neutralisation à large spectre du mAb RVC20 (De Benedictis et al., 2016), bien qu'une étude expérimentale plus approfondie soit nécessaire pour permettre d'envisager le design de traitement pan-Lyssavirus sur des bases rationnelles.

### Machinerie de fusion

#### Étude de l'organisation de Ikoma G à pH acide

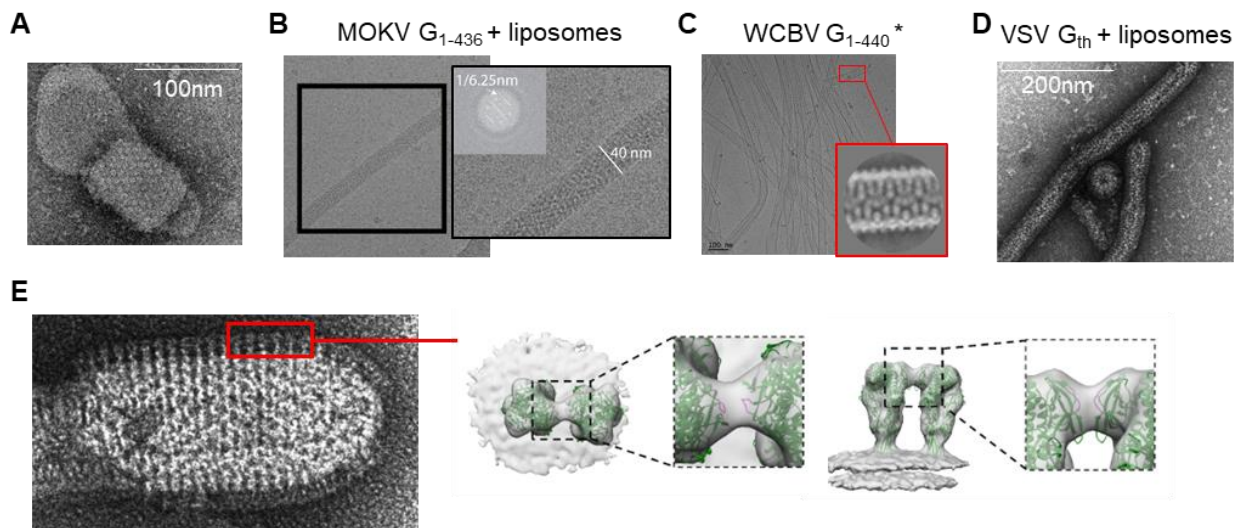
Il a été montré à plusieurs reprises que les ectodomaines de LYSV G ont la capacité de s'assembler sous forme de tubes, constitués de trimères post-fusion de G et présentant une symétrie hélicoïdale en présence d'une cible lipidique à pH acide (**Figure 67.A-B**) (Belot et al., 2020). Ces assemblages constituent une opportunité unique pour étudier la structure de ces conformations trimériques.

L'ectodomaine de MOKV G WT (dont les boucles de fusion sont non mutées) interagit effectivement à bas pH avec les membranes *via* ses boucles de fusion hydrophobes et est capable de les déformer (Belot et al., 2020) (**Figure 67.A**). L'assemblage de MOKV G sous forme de réseaux réguliers à la surface des liposomes entraîne la formation de tubes protéolipidiques (Belot et al., 2020) similaires à ceux déjà observés pour l'ectodomaine de VSV G (Libersou et al., 2020) (**Figure 67.C**). Cette propriété particulière rappelle de nouveau la capacité de l'ectodomaine des glycoprotéines de Rhabdovirus à interagir et à déformer les membranes.

L'ectodomaine de WCBV G muté au niveau des boucles de fusion est, lui, capable de former à pH acide ces assemblages hélicoïdaux, en l'absence de membranes similaires à ceux observés à la surface des particules virales à la fin du processus de fusion (**Figure 67.B**).



Si l'observation par coloration négative à pH acide de l'ectodomaine muté de Ikoma G au niveau des boucles de fusion a montré qu'il ne partageait pas la même propriété que WCBV G, il serait intéressant d'évaluer la capacité de l'ectodomaine de Ikoma G WT, avec des boucles de fusion non mutées, à former ces assemblages hélicoïdaux à pH acide en présence de membranes. L'étude de la structure de ces assemblages par cryo-EM et par reconstruction 3D hélicoïdale permettrait d'accéder à la structure à haute résolution des trimères post-fusion de Ikoma G.



**Figure 67. Réseaux hélicoïdaux formés par les LYSV G à bas pH**

(A) Réseau formé par MOKV G à la surface de particules virales de VSV pseudotypées par MOKV G à pH 5,5 (Belot et al., 2020). (B) Structures tubulaires protéolipidiques d'ectodomaines de MOKV G à pH 5,5 en présence de liposomes dans la glace (Belot et al., 2020) (C) Structures tubulaires d'ectodomaines de WCBV G mutés au niveau des boucles de fusion à pH 5,5 en absence de liposome dans la glace, formant des tubes protéiques similaires dans leur organisation à ceux présentés en B. (D) Structures tubulaires d'ectodomaine de VSV G à pH 5,2 en présence de liposome en coloration négative (Libersou et al., 2010). (E) Sub-tomogrammes moyens de deux trimères voisins de G de VSV, en vue du dessus (milieu) et latérale (droite), dans lesquels sont replacés la structure cristallographique du trimère post-fusion de VSV G. Les résidus 8-14 sont en magenta et pourraient être impliqués dans l'interaction entre les trimères de G à pH acide (Zhou et al., 2022).

Il est intéressant de noter que la formation de tels réseaux de glycoprotéines en présence de membranes est une propriété relativement conservée chez les glycoprotéines de fusion de classe III et a également été observée avec la glycoprotéine de virus de la maladie d'Aujeszky (PRV) (Vallbracht et al., 2017). Ceci rappelle également le comportement de glycoprotéines de fusion de classes II qui, sous leur conformation post-fusion, forment des réseaux réguliers différents de leur organisation icosaédrique initiale (Stiasny et al., 2004 ; Gibbons et al., 2003). Il est proposé que la formation des réseaux hélicoïdaux à la surface des particules virales à bas pH joue un rôle important dans l'achèvement de la fusion membranaire (i.e. formation et/ou élargissement du pore de fusion) (Libersou et al., 2020).

De ce fait, il serait intéressant de valider l'existence de ce réseau à la surface de particules virales exprimant Ikoma G à bas pH. Pour cela, il est prévu d'observer la morphologie de Ikoma G à la surface de pseudotypes VSVΔG-GFP/Ikoma G par microscopie électronique (EM) comme réalisé précédemment avec MOKV G (Belot et al. 2020). Les premiers essais réalisés au cours de cette thèse n'ont pas permis d'obtenir des particules virales de qualité suffisante pour la microscopie électronique, en particulier à cause de l'incorporation de Ikoma G dans les pseudotypes VSVΔG-GFP largement insuffisante. Plusieurs stratégies sont envisagées pour pallier à ce problème, notamment la délétion d'un nombre choisi de résidus au niveau de la partie intravirale (ICD) de Ikoma G. Il s'agit d'une stratégie utilisée couramment qui permet d'optimiser la formation de pseudotypes en réduisant la gêne stérique présente entre la protéine de matrice ou la capsid virale et la G hétérologue (Mammamo et al., 1997, Höne et al., 1999, Funke et al., 2008, Bender et al., 2016, Yu et al., 2021).

En plus de confirmer l'existence de ce réseau hélicoïdal formé par Ikoma G à bas pH, ces observations par EM et cryo-EM permettraient d'envisager l'étude de l'organisation de Ikoma G dans son environnement naturel (i.e. à la surface de particules virales) par cryo-tomographie électronique (cryo-ET). Cette technique permet, à partir de vues bidimensionnelles d'un échantillon, de reconstruire une image 3D, ou tomogramme, de la structure étudiée avec une résolution de l'ordre du nanomètre.

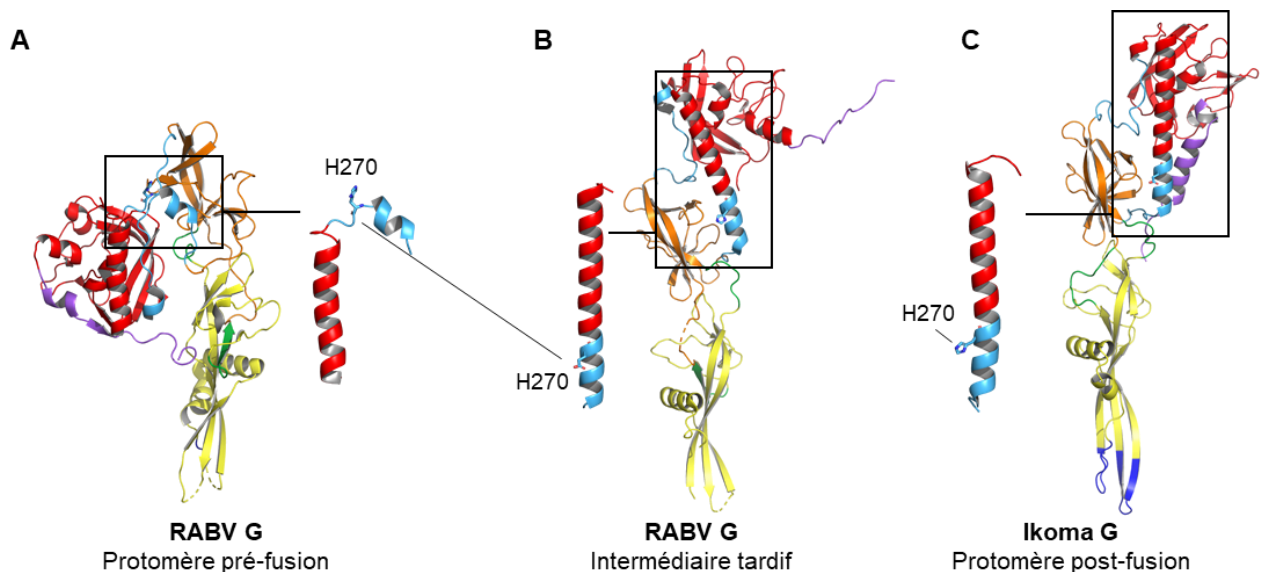
Enfin, la formation des réseaux hélicoïdaux de glycoprotéines à pH acide met en jeu des contacts latéraux entre les têtes globulaires des trimères de G. La résolution de ces structures permettrait donc l'identification de résidus potentiellement clés dans ces interactions. Dans leur étude par cryo-ET de la particule virale de VSV, Zhou et al., proposent que ce soient les résidus 8 à 14 qui soient impliqués dans ces contacts latéraux entre les conformations trimériques post-fusion de VSV G (**Figure 67.D**) (Zhou et al., 2022). Ces résidus incluent notamment les résidus P13, S15 et K10 qui sont identifiés chez RABV G comme résidus reconnus par des mAbs neutralisants ciblant la conformation post-fusion de RABV G (Raux et al., 1995). Dans cette étude, les mutants RAIN, pour *resistant to acid induced neutralisation*, ont été identifiés : P13S/L, S15N/R/I et K10E (Raux et al., 1995). Il était proposé, entre autres, que ces résidus puissent intervenir dans le changement de conformation de G et que les mutations identifiées bloquent G dans sa conformation pré-fusion (Raux et al., 1995). Compte-tenu de l'observation faite par Yang et al., il serait effectivement intéressant de confirmer le rôle de ces résidus dans le processus de fusion médié par G, et notamment leur rôle potentiel dans la formation du réseau de trimères post-fusion de G à la surface des particules virales.

De façon similaire à ce qui a été proposé pour VSV G (cf. **Partie I-IV.A**), il serait intéressant de valider fonctionnellement ces résidus sur les LYSV G, notamment par l'étude de mutants de Ikoma G, conçus rationnellement sur la base des structures atomiques ou des modèles pseudo-atomiques (mutagenèse couplée à des tests de fusion cellule-cellule).

### Étude des différentes conformations de G

A l'instar du travail réalisé sur VSV G au cours de cette thèse, il serait intéressant d'étudier les structures entières (i.e. avec l'ancre transmembranaire et le domaine intraviral) de Ikoma G et plus largement des LYSV G. Cela nous permettrait de confirmer ou non l'implication et les caractéristiques de ces éléments de la machinerie de fusion, notamment la flexibilité du domaine transmembranaire et du domaine intraviral. Actuellement, la limite la plus importante à cette étude repose la production d'un tel échantillon de manière recombinante. Effectivement, l'extraction à partir de particules virales n'est pas envisageable (les LYSV sont de catégorie BSL3) et leur incorporation en pseudotype est insuffisante (voir **p.150**). Plusieurs systèmes d'expression recombinants sont envisagés, dont le système développé par Elegheert et al., 2018. Ce système de transduction par lentivirus de cellules de mammifères permet d'exprimer de manière constitutive ou inducible de protéines membranaires en cellules de mammifères Hek 293T par exemple (Elegheert et al., 2018).

Il serait ainsi intéressant d'étudier les formes trimériques à pH neutre et acide de Ikoma G. Ng et al. ont confirmé la possibilité de stabiliser le trimère pré-fusion de RABV G en substituant le résidu H270 par une proline, ce qui empêche la transition structurale de G et la bloque dans sa conformation pré-fusion (Ng et al., 2022). Cette propriété avait d'ailleurs été démontrée par notre équipe chez VSV G avec la mutation équivalente L271P (Ferlin et al., 2014). Sur l'ectodomaine du protomère post-fusion de Ikoma G, ce résidu H270 est localisé dans le même environnement à bas pH que sur l'intermédiaire tardif de RABV G (**Figure 68**), et il en est de même dans la modélisation du protomère pré-fusion de Ikoma G (**Figure 68**). La mutation H270P semble donc un bon candidat pour stabiliser le trimère pré-fusion de Ikoma G.



**Figure 68. Localisation de l'histidine 270**

**(A)** Localisation de H270 sur le protomère pré-fusion de RABV G (PDB : 7u8g) et **(B)** l'intermédiaire tardif de RABV G (PDB : 6lgw). **(C)** Localisation de H270 sur le protomère post-fusion de Ikoma G.

Enfin, nous avons pu sélectionner 6  $\alpha$ Reps dirigées contre Ikoma G<sub>1-440</sub>\*. Ces protéines artificielles ont été décrites comme des aides à la cristallisation (Urvoas et al., 2010) et pourraient éventuellement aider à piéger d'autres conformation de l'ectodomaine de Ikoma G, ce qui permettrait d'affiner notre connaissance du paysage des conformations des LYSV G au cours de la transition structurale.

### Étude des interrupteurs sensibles au pH

Plusieurs résidus pouvant jouer le rôle d'interrupteurs sensibles au pH ont été identifiés sur la structure cristallographique de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* par comparaison avec l'intermédiaire tardif de RABV G (Yang et al., 2020) : D211, H261, E269 et D266 (**Figure 60, Figure 59.A**). Leur localisation dans la conformation post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub>\* tend à confirmer les résultats observés chez RABV G (**Figure 59.B**) : ils permettent de stabiliser l'hélice centrale étendue du TrD-R4 contre le domaine PHD de G. De façon similaire à ce qui a été réalisé par Yang et al., 2020, leur rôle peut être confirmé par des expériences de mutagenèse couplées à des tests de fusion cellule-cellule.

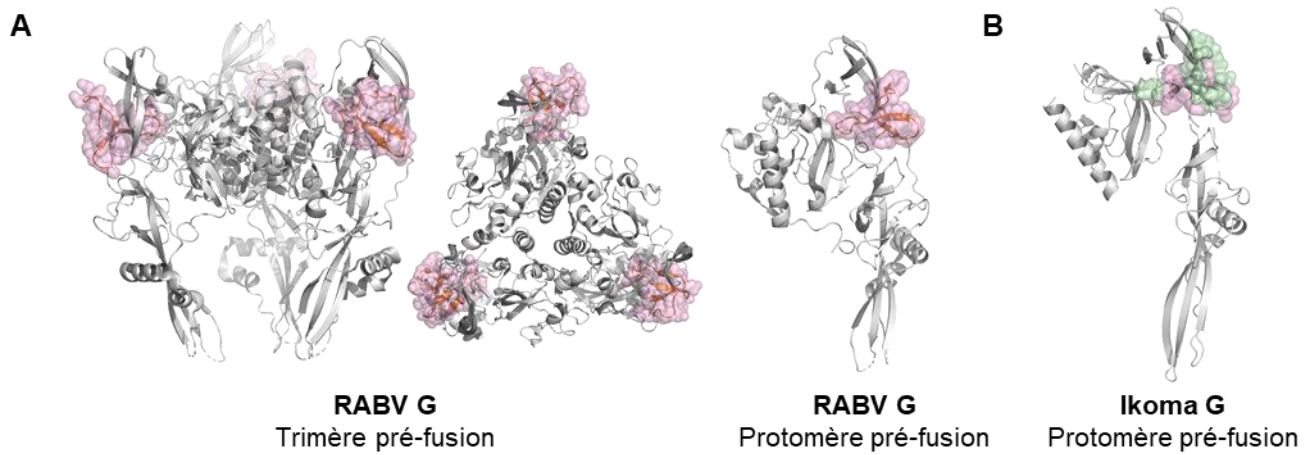
Ensuite, la modélisation du trimère post-fusion de Ikoma G<sub>1-440</sub> laisse penser que le motif de trimérisation de Ikoma G diffère de celui proposé pour MOKV G : les hélices centrales du TrD sont droites chez Ikoma G, tandis qu'elles sont courbées chez MOKV G (Belot et al., 2020) (**Figure 60.A**). Ikoma G présenterait donc un motif de trimérisation en faisceau d'hélice, comme cela est observé chez les Vésiculovirus, tandis que MOKV G présenterait un motif *coiled-coil*, comme cela est observé chez glycoprotéines de classe I (voir **Introduction-II.B.2.b**). A ce titre, la résolution des structures trimériques post-fusion de ces deux LYSV G permettrait de confirmer ces hypothèses et de permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu au cours de la transition structurale de G dans les deux cas. Les résidus permettant l'interaction des protomères entre eux au sein des trimères modélisés sont différents dans les deux cas, ce qui s'explique par ce motif de trimérisation différent. Comme proposé précédemment, dans le cas de Ikoma G<sub>1-440</sub>\*, il serait pertinent de valider le rôle de ces résidus dans la trimérisation de G à pH acide par des expériences de mutagenèse couplées à des tests de fusion cellule-cellule. Si des résidus sont effectivement identifiés comme important pour le changement de conformation de G, il serait intéressant d'identifier des mutations compensatoires qui permettraient d'approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la transition de Ikoma G, comme cela a été fait précédemment (Ferlin et al., 2014, Beilstein et al., 2020).

## Antigénicité

La résolution de la structure post-fusion de l'ectodomaine de Ikoma G a permis d'amener des premières informations sur la neutralisation de Ikoma G par le mAb à large spectre RVC20. Néanmoins, il serait intéressant de résoudre la structure de ce complexe à haut pH, afin de confirmer l'épitope identifié sur Ikoma G.

Il a récemment été démontré qu'il est possible de générer un vaccin à large spectre contre des LYSV fortement divergents (i.e. RABV et MOKV) en se basant sur les données structurales pour définir des épitopes chimériques de neutralisation (Fisher et al., 2020, Ben Hamed et al., 2024). Le travail initié sur l'étude structurale de Ikoma G permettrait d'élargir cette approche à des LYSV G plus divergents. Dans l'étude menée par Ben Hamed et al., 2024, ces derniers définissent un épitope chimérique compris entre les résidus 222 et 252, qui correspond à la zone de G la plus exposée au solvant dans sa conformation pré-fusion (**Figure 69**). Ces résidus correspondent également à la partie la plus exposée de Ikoma G sur le protomère pré-fusion modélisé (**Figure 69**) et contient la majeure partie de l'épitope identifié de Ikoma G contre RVC20. Il pourrait donc être intéressant d'inclure Ikoma G dans la conception d'un épitope chimérique dans cette région par exemple (**Figure 69**). Il serait également intéressant de cibler d'autres régions de G dans le *design* d'épitopes chimériques, notamment la région comprenant les sites antigéniques I et III, plus prépondérants dans la neutralisation des LYSV du phylogroupe I.

D'autre part, il a été montré que les  $\alpha$ Reps peuvent présenter des propriétés antivirales. Par exemple, des  $\alpha$ Reps ont été sélectionnées contre la nucléocapside du VIH-1 et interfèrent négativement avec la maturation du virus (Hadpech et al., 2017). D'autres encore, ont été sélectionnées contre la spike du SARS-CoV 2 et présentent une forte activité antivirale (Thébault et al., 2022). Il serait intéressant de tester les potentielles propriétés de neutralisation des  $\alpha$ Reps que nous avons sélectionnées contre Ikoma G, mais également leur capacité à interagir avec d'autres LYSV, comme cela a été reporté par exemple pour les  $\alpha$ Reps sélectionnées contre le SARS-CoV 2 (Thébault et al., 2022). Enfin, il pourrait être pertinent d'effectuer une sélection d' $\alpha$ Reps contre cette G chimérique puis d'étudier leur potentiel neutralisant.



**Figure 69. Étude *in-silico* d'un potentiel épitope pan-Lyssavirus**

**(A)** Localisation de la région 222-252 sur le trimère pré-fusion, en vue latérale et du dessus, et sur le protomère de RABV G (PDB : 7u9g). **(B)** Localisation de la région 222-252 sur le protomère modélisé de Ikoma G. Les régions ayant les mêmes résidus que RABV G sont en rose, celles différentes en vert.



# Annexes



	10	20	30	40	50	60	70																																																												
VSVIG	1	----	MKCLLYLAFLSIGVNC	KFTIVFPHNQKGTWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHDNLIGTALQVKMPKSHKAIQ	69																																																														
MARAVG	1	----	MLRLLFCFLALGAH	SKFTIVFPHHQGNWKNVPSYHYCPSSSDQNWHDNLTVSLHVKIPKSHKAIQ	69																																																														
COCVG	1	----	MNFLLLLTIVLPLCS	HAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSYHYCPSSSDQNWHDNLIGITMVKMMPKTHKAIQ	70																																																														
VSV Algoas G	1	----	MTPAFILCMLLAGSS	WAKFTIVFPQSQKGNWKNVPSYHYCPSSSDQNWHDNLIGITMVKMMPKTHKAIQ	70																																																														
VSV NJG	1	----	MLSYLIFALVVPSPIL	KIEIVFPQHTTGDWRKVPHEYNYPCTSDAKNSHGQTGIPVELTMPKGLTTHQ	69																																																														
PiryVG	1	----	MDLFPILVVLMTD	TVLGGKQIVFPDQNELEWRPVGDSRHCPSSEMQFDGSRSTILTGKAPVGIPTPSK	71																																																														
CHAVG	1	MTS	SVTISVILLISFIAPS	YSLSLAFAPENTKLDWKPVTKNTRYCPMGGGEWFLEPGLQEESFLSSTPIGATPSK	74																																																														
ISFG	1	MT	SVLFMVGVLGAFG	STHCSIQIVFAPSETKLVWKPVLKGTTRYCPQSAELNLEPDLKTMAFDSKVPVIGITPSN	73																																																														
	80	90	100	110	120	130	140																																																												
VSVIG	70	ADGWMCHAS	KWVTTCDFRWYGPKY	ITHSIRSF	TFSVEQCRESIEQTKQG	TWLNPGFPPQSCGYATV	DAEAVIV	143																																																											
MARAVG	70	ADGWMCHAAK	WVTTCDFRWYGPKY	ITHSIHSM	PTLEQCKTSIEQTKQGV	WVNPFGFPPQSCGYATV	DAEVVVV	143																																																											
COCVG	71	ADGWMCHAAK	WITTCDFRWYGPKY	ITHSIHQ	PTSECKESIKQTKQGT	WMSPGFPPQSCGYATV	DSAVVV	144																																																											
VSV Algoas G	71	ADGWMCHAAK	WVTTCDYRWYGPQY	ITHSIH	SFIP	TAKQCEESI	KQTKQGV	WVNPFGFPPQSCGYATV	DSAVVV																																																										
VSV NJG	70	VDGFMCHS	ALWMTTCDFRWYGPKY	ITHSIH	NEEPTDYQCLEA	IKAYKDG	VSFNPGFPPQSCGYATV	DAEAHIV	143																																																										
PiryVG	72	SDGF	ICHAAK	WVTTCDFRWYGPKY	ITHSIH	HLRPTTSD	CETALQRYK	DSLINLGFPPQSCGYATV	SEAMLV	145																																																									
CHAVG	75	SDGF	LCHAAK	WVTTCDFRWYGPKY	ITHSIH	NIKPT	RSDDTALASYK	SGTLVSPGFPPQSCGYATV	SEFLVI	148																																																									
ISFG	74	SDGYL	CHAAK	WVTTCDFRWYGPKY	ITHSV	HSLRPT	VSDCKAAVEAYNA	GLTMYPGFPPQSCGYATV	DSFVYM	147																																																									
	150	160	170	180	190	200	210	220																																																											
VSVIG	144	QVTPHHVL	VDEYTG	EWDSQFIN	GKCSNDI	CPTVHNSTT	WHSDYKVKGL	CDSNLSMDIT	FFSEDEG	ELSSLGK	216																																																								
MARAVG	144	QATPHHVL	VDEYTG	EWIDSQLV	GKCSKEV	CQTVHNSTV	WHADYKIT	GLCESNLAS	VDIT	FFSEDEG	GKTSLGK	216																																																							
COCVG	145	QATPHHVL	VDEYTG	EWIDSQLV	GKCSKEV	CETVHNSTV	WVSDYKVT	GLCDATL	VDTEI	FFSEDEG	GKTSLGK	217																																																							
VSV Algoas G	145	QATPHHVL	VDEYTG	EWIDSQLV	GKCSKEV	CETVHNSTV	WVSDYKVT	GLCDATL	VDTEI	FFSEDEG	GKTSLGK	217																																																							
VSV NJG	144	TVTPHSVK	VDEYTG	EWIDSQLV	GKCSKEV	CETVHNSTV	WVSDYKVT	GLCDATL	VDTEI	FFSEDEG	GKTSLGK	216																																																							
PiryVG	146	QVTPHHV	VDYR	GHWID	PLFPGG	ECSNF	CDT	VHNSVWI	PKSQKTD	ICAQ	SFKNIKMTASYP	SEGA	216																																																						
CHAVG	149	MITPHH	VVDYR	GHWID	PLFVGG	ECDSQ	SYCDT	IHNSSVWI	PKSQKTD	ICAQ	SFKNIKMTASYP	SEGA	216																																																						
ISFG	148	LVTPHH	VVDYR	GHWID	PLFVGG	ECDSQ	SYCDT	IHNSSVWI	PKSQKTD	ICAQ	SFKNIKMTASYP	SEGA	216																																																						
	230	240	250	260	270	280	290																																																												
VSVIG	217	EGTGR	FRSNHFAYET	GDKACK	MKYQKHW	VRVLP	SGVWFEMAD	QDLFAA	----	ARF	PECP	ESS	ISAP	SQTS	VDVS	286																																																			
MARAVG	217	PNTG	FRSNHFAYES	GDKACK	MKYQKHW	VRVLP	SGVWFEMAD	QDLFAA	----	AKL	PECP	ESS	ISAP	SQTS	VDVS	286																																																			
COCVG	218	PNTG	FRSNHFAYES	GDKACK	MKYQKHW	VRVLP	SGVWFEMAD	QDLFAA	----	AKL	PECP	ESS	ISAP	SQTS	VDVS	287																																																			
VSV Algoas G	218	QNTG	FRSNHFAYES	GDKACK	MKYQKHW	VRVLP	SGVWFEMAD	QDLFAA	----	AKL	PECP	ESS	ISAP	SQTS	VDVS	287																																																			
VSV NJG	217	PETG	FRSNHFAYES	GDKACK	MKYQKHW	VRVLP	SGVWFEMAD	QDLFAA	----	AKL	PECP	ESS	ISAP	SQTS	VDVS	286																																																			
PiryVG	217	DRFA	FHSAYHPNMP	GSTVC	IMDF	CEQK	GLRFT	NSG	EWMLN	VEQS	IREK	KISA	IFR	NC	VAGTE	IRAT	LE	SE	GA	290																																															
CHAVG	221	GAV	FHSAYHPNMP	GSTVC	IMDF	CEQK	GLRFT	NSG	EWMLN	VEQS	IREK	KISA	IFR	NC	VAGTE	IRAT	LE	SE	GA	290																																															
ISFG	220	ADLT	LKSKF	HAHMK	GRVCK	MKFC	DNK	NBLRL	GNB	EWIE	EVG	DEV	MLD	NSK	LLS	LFP	DL	VG	SVV	KST	LL	SE	G	V	Q	293																																									
	300	310	320	330	340	350	360																																																												
VSVIG	287	LID	VERILD	YSLCQ	ETWSK	IGAGLP	ISPV	DLSY	LAPK	NP	GTG	PAFT	I	ING	T	L	KY	F	E	T	R	I	R	V	D	I	A	A	P	I	L	S	R	M	V	360																															
MARAVG	287	LID	VERILD	YSLCQ	ETWSK	IRAKLP	SPV	DLSY	LAPK	NP	GTG	PAFT	I	ING	T	L	KY	F	E	T	R	I	R	V	D	I	A	A	P	I	L	S	R	M	V	360																															
COCVG	288	LID	VERILD	YSLCQ	ETWSK	IRSKQP	SPV	DLSY	LAPK	NP	GTG	PAFT	I	ING	T	L	KY	F	E	T	R	I	R	V	D	I	A	A	P	I	L	S	R	M	V	361																															
VSV Algoas G	288	LID	VERILD	YSLCQ	ETWSK	IRSKQP	SPV	DLSY	LAPK	NP	GTG	PAFT	I	ING	T	L	KY	F	E	T	R	I	R	V	D	I	A	A	P	I	L	S	R	M	V	361																															
VSV NJG	291	LIS	VERILD	YALCQ	NTWSK	IEAGEP	ITPV	DLSY	LAPK	NP	GTG	PAFT	I	ING	T	L	KY	F	E	T	R	I	R	V	D	I	A	A	P	I	L	S	R	M	V	364																															
PiryVG	291	LW	ETQR	MLD	YSLCQ	NTW	KVSR	KEPL	SPL	DLSY	LAPK	NP	GTG	PAFT	I	ING	T	L	KY	F	E	T	R	I	R	V	D	I	A	A	P	I	L	S	R	M	V	364																													
CHAVG	295	LT	SEI	QR	ILD	YSLCQ	NTW	KVSR	KEPL	SPL	DLSY	LAPK	NP	GTG	PAFT	I	ING	T	L	KY	F	E	T	R	I	R	V	D	I	A	A	P	I	L	S	R	M	V	368																												
ISFG	294	AL	WET	DR	LL	YSLCQ	NTW	KVSR	KEPL	SPL	DLSY	LAPK	NP	GTG	PAFT	I	ING	T	L	KY	F	E	T	R	I	R	V	D	I	A	A	P	I	L	S	R	M	V	367																												
	380	390	400	410	420	430	440																																																												
VSVIG	361	GMI	SGT	TTER	ELW	DWAP	YED	VEIG	PN	GLRT	SSG	YK	F	P	L	Y	M	I	G	H	G	M	L	S	D	L	H	L	S	K	A	Q	V	F	E	H	P	H	I	Q	D	A	A	S	Q	L	433																				
MARAVG	361	GTM	SGT	TTER	ELW	DWAP	YED	VEIG	PN	GLRT	SSG	YK	F	P	L	Y	M	I	G	H	G	M	L	S	D	L	H	L	S	K	A	Q	V	F	E	H	P	H	I	Q	D	A	A	S	Q	L	433																				
COCVG	362	GKI	SGS	TTER	ELW	DWAP	YED	VEIG	PN	GLRT	SSG	YK	F	P	L	Y	M	I	G	H	G	M	L	S	D	L	H	L	S	K	A	Q	V	F	E	H	P	H	I	Q	D	A	A	S	Q	L	434																				
VSV Algoas G	362	GKV	SGT	TTER	ELW	DWAP	YED	VEIG	PN	GLRT	SSG	YK	F	P	L	Y	M	I	G	H	G	M	L	S	D	L	H	L	S	K	A	Q	V	F	E	H	P	H	I	Q	D	A	A	S	Q	L	434																				
VSV NJG	365	GKV	AG	TR	I	VR	QL	W	Q	W	F	P	F	G	E	V	E	I	G	P	N	G	L	K	T	P	G	K	F	P	L	H	I	I	G	T	E	V	D	N	I	K	M	E	R	I	V	K	H	W	E	H	P	H	I	E	A	Q	T	F	L	437					
PiryVG	365	GKR	GEYS	KAP	ELL	W	S	Q	W	F	D	G	F	P	K	I	G	P	N	G	L	L	H	T	G	K	F	K	F	L	L	I	G	A	I	I	D	E	L	H	E	L	E	A	A	P	I	D	H	P	M	D	A	K	S	L	438										
CHAVG	369	GKR	ES	PS	G	ISS	D	I	W	T	Q	W	F	K	G	D	M	E	I	G	P	N	L	L	K	T	A	G	G	K	F	P	W	H	L	I	G	M	I	V	D	N	E	L	H	E	L	S	E	A	N	P	L	D	H	Q	L	P	A	Q	S	I	A	442			
ISFG	368	GK	ES	SA	S	G	I	D	T	V	L	W	E	Q	W	L	P	F	N	G	M	E	L	G	P	N	L	I	K	T	K	S	G	Y	K	F	P	L	L	G	M	I	V	D	Q	D	L	Q	E	L	S	S	V	N	P	V	D	H	P	V	I	A	Q	A	F	V	441
	450	460	470	480	490	500	510																																																												
VSVIG	434	P	---	DD	ET	L	F	F	G	D	T	G	L	S	K	N	P	I	E	L	V	E	G	W	F	S	G	W	K	S	I	A	S	F	F	I	I	G	L	I	G	L	F	L	V	L	R	V	G	I	L	C	I	K	L	K	H	T	K	R	Q	I	Y	T	---	502	
MARAVG	434	P	---	DD	ET	L	F	F	G	D	T	G	L	S	K	N	P	I	E	L	V	E	G	W	F	S	G	W	K	S	I	A	S	F	F	I	I	G	L	G	V	A	L	I	F	I	R	I	I	V	A	I	R	Y	K	Y	K	R	K	Q	I	Y	N	---	502		
COCVG	435	P	---	EE	ET	L	F	F	G	D	T	G	L	S	K	N	P	I	E	L	V	E	G	W	F	S	G	W	K	S	I	A	S	F	F	I	I	G	V	F	I	L	L	V	V	A	R	I	V	A	R	Y	R	Y	Q	G	S	N	K	R	I	Y	N	---	503		
VSV Algoas G	435	P	---	DD	ET	L	F	F	G	D	T	G	L	S	K	N	P	I	E	L	V	E	G	W	F	S	G	W	K	S	I	A	S	F	F	I	I	G	V	F	I	L	L	V	V	A	R	I	V	A	R	Y	Q	G	S	N	K	R	I	Y	N	---	502				
VSV NJG	438	K	K	D	T	E	E	V	L	Y	G	D	T	G	V	S	K	N	P	I	E	L	V	E	G	W	F	S	G	W	K	S	I	A	S	F	F	I	I	G	V	F	I	L	L	V	V	A	R	I	V	A	R	Y	Q	G	S	N	K	R	I	Y	N	---	509		
PiryVG	439	P	---	EE	ET	L	F	F	G	D	T	G	L	S	K	N	P	I	E	L	V	E	G	W	F	S	G	W	K	S	I	A	S	F	F	I	I	G	V	F	I	L	L	V	V	A	R	I	V	A	R	Y	Q	G	S	N	K	R	I	Y	N	---	509				
CHAVG	443	D	---																																																																

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170

RABV G 1 K F P I Y T I P D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L S G F S Y M E L K V G Y I T S I K V S F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R T P D A C R A A Y N W K M A G D P R Y E E S L H N P Y P D Y H W L R T V T T T K E S L L I S P S V A D L D P O R S L H S R V F P G G N C S G V A V S S T Y C S T N H D Y T I W M F 180

ABL V G 1 Q F P L V A I P D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L S G F S Y M E L K V G F I T T I K V S F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R T P E S C R K A Y N W K I A G D P R Y E E S L H N P Y P D Y H W L R T V T T T K E S L L I S P S V V D M D P D K S L H S K M F P F K G S C S G A S I P S V F C S T N H D Y T I W M F 180

GBL V G 1 K F P I Y T I P D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L S G F S Y M E L K V G Y I T T I K V S F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R T P D G C R N A Y N W K T A G D P R Y E E S L H N P Y P D Y H W L R T V T T T K E S L L I S P S V V D M D P D K S L H S K M F P T G R G S G I S V S T S C S T N H D Y T I W M F 180

ARAV G 1 K F P I Y T I P D K I G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L T A F S Y M E L K V G Y I T T I K V S F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R T A S A C R A Y N W K A T G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T T K E S L L I S P S V A D M D A Y D K A L Y S K I F R N G K L G V S L S S F C S T N H D Y T I W M F 180

KBLV G 1 F P I Y T I P D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L S A F S Y M E L K V G Y I T T I K V S F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R T P N A C R A D A Y S W K V T G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T T K E S L L I S P S V V D M D A Y D K S L H S K M F T D G K S G V S A I S P F C S T N H D Y T I W M F 179

EBLV2 G 1 K F P I Y T I P D K I G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L T V G S Y M E L K V G Y I T T I K V N F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R S P S A C R D A Y S W K T A G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T T K E S V L I S P S V A D M D A Y D K T L Y S K I F R N G K L G V S V Q S V S F C S T N H D Y T I W M F 180

KHLV G 1 K F P I Y T I P D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L S G F S Y M E L K V G Y I T T I K V D F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R P S A C R D A Y N W K A T G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T T K E S L L I S P S V D M D A Y D K S L S K I F R N G K P G V S A I S P F C S T N H D Y T I W M F 180

BBLV G 1 K F P I Y T I P D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L T V G S Y M E L K V G Y I T T I K V S F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R P D A C R A Y N W K T A G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T T K E S L L I S P S V A D M D A Y D K S L Y S K I F P D O K S G I S A V S F C P T N H E Y T I W M S 180

IRKV G 1 K F P I Y T I P D K I G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L T A F S Y M E L K V G Y I T T I K V S F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R P N S A C R A F S W K T A G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T T K E S L L I S P S V D M D A Y D K T L Y S K M F P G K D F P I S D S R F C S T N H D Y T I W L F 180

TWBLV G 1 Y F P I Y T I P D K I G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L S F S Y M E L K I S Y I K A I K V S F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R T M S G O C R A Y R W K I T G D P R Y E E S L H N P Y P D S S H W L R T V T T T K E S L L I S P S V A D M D A Y D K T L Y A P I P D G K T N L L P G A F Y C S T N H E Y T I W M F 180

DUVV G 1 K F P F Y T I P D K L G P W S P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L T P F S Y M E L K V G Y I T S I K V S F T C T G V V T E A E T Y T N F V G V Y T T F R R R H F R P S V N S C R D A Y N W K I A G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V K T T K E S L L I S P S V A D M D A Y D K L Y S K I V S N O R C S E I S P S S F C P T N H E Y T I W M F 180

EBLV1 G 1 E F P L Y T I F E K I E K W T P I D I H H L S C P N N L V E D E G C T L T P F S Y M E L K V G Y I T T I E S F T C T G V I T E A E T Y T N F V G V Y T T F R K R H F R T V S A C R D A Y N W K I T G D P R Y E E S L H N P Y P D S H W L R T V T T T K E S L L I S P S V D M D A Y D K N L Y S K M F P N G K L A S P P S A I C P T N H D Y T I W I F 180

MOKV G 1 D F P L Y T I F E R L N P W T P I D I H H L S C P N N L S D A E G C S E T S S T Y V E L K T G F L A H Q K V P F T C T G V I N E A V T Y T N F V G V Y T T F R K R H F K P T A S A C R D A Y N W K V S G D P R Y E E S L H P Y P D S N S W L R T V T T T K E S L L I S P S I V E M D V G R T L H S P M F P T G I C S K F Y P S I P S C A T N H D Y T I W L F 180

LBV G 1 D F P L Y T I F E K I E K W T P I D L T H L S C P N N L S E D D C S S S T S Y I E L R T G V L T H Q V S F T C T G V I N E A V T Y T N F V G V Y T T F R K R H F K P T A S A C R D A Y N W K I S D P R Y E E S L H P Y P D S N S W L R T V T T T K E S L L I S P S I V E M D I S R S L H S P M F T G R Y D F Y K S T P S C L T N H D Y T I W L F 180

MOKV G 1 L F P L Y T I F D H L G P W T P I D L S H L C P N N L Y T D A S Y C T T E Q S I T Y T E L K V G S S Q N I P S F T C T G V I T E A V T Y T N F V G V Y T T F R K R H F P K S R D C R E A Y E R K K A G D P R Y E E S L H P Y P D S N S W L R T V T T T K E S V V I L E P S V V E L D I T S A L Y S P M F T G R Y D G T S K S R T S P Y C P T N H D Y T I W M F 180

SHBV G 1 I F P M Y T I F D L G P W T P I D L S H L K P D N T Y F A E E G N E G S K V T L K P S F S H S Q N K V G F T C T G I N M A T Y T N F V G V Y T T F Q R S H F I N Q R D C R A E R E W K T A G D P R Y E E S L T P Y P D S K W L R T V T T S K E S V L I L D A V V E M D I Y N K T M F S P V L R N G K S G V S P E N P D C E T N H Q S I W I P 180

IKoma G 1 I F P L Y T I F D S I G P W T P I D L S H L K P D N A F I V D E N C T D H G E I N S E L K P S F S H S Q S K V P F T C T G I V T C A V Y T N F L G V S T T F Q R S H F V N P R E C R A A Q E W K S K D P R Y E D S L Q N P Y P D S K W L R T V T T T R E S L L I T E R A I A E M D I Y N K T M F S V F R G G L D F S R G N P D Y C E I S H S Y S I W M F 180

LLEBV G 1 I F P L Y T I F D S I G P W T P I D L S H L K P D N A F I V D E N C T D H G E I N S E L K P S F S H S Q S K V P F T C T G I V T C A V Y T N F L G V S T T F Q R S H F V N P R E C R A A Q E W K S K D P R Y E D S L Q N P Y P D S K W L R T V T T T R E S L L I T E R A I A E M D I Y N K T M F S V F R G G L D F S R G N P D Y C E I S H S Y S I W M F 180

190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350

RABV G 181 E N P R L G M S C D I F T T S R G K R A S K G S E T C G F V D E R G L Y K S L K G A C K L K C G V L G L R L M D G T W V A M O T S N E T K W C P F G D L V N L H D F R S D E I E H L V E E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I F N K T L M E A D A H Y K S V R T N E I I P S K G C L R V G G R C H P H V N G V F F 360

ABL V G 181 E D S N S G M S C D I F T T S K G K K A S K G G K V C G F V D E R G L Y K S L K G A C K L K C G I S G L R L L D G S W V S I Q N H E E V K W C S F N D L V N I H D F N A D E I E H L V E E L I K E R E E C L D A L E S I I T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N K T L M E A D A H Y K S V R T N E I I P S K G C L K V R E K C H P P Y N G V F F 360

GBL V G 181 E D P K P G S C D I F T T S K G K K A S K G G K I C G F V D E R G L Y K S L K G A C K L K C G I S G L R L M D G S W V S I Q N P E D T K W C S D D L V S I H D F H S D E I E H L V E E L V K K R E E C L D A L E S I V T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I V N K T L M E A D A H Y K S V R A N N E I I P S K G C L K V G E R C Y P P F N G V F F 360

ARAV G 181 E N P K P G V S C D I F T T S K G K K A T K D G K L C G F V D E R G L Y K S L K G A C K L K C G V M L R L M D G S W V S L Q K T E E S E W C S F N D L I N I H D F H S D E I E H M V V E E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N K T L M E A D A H Y K S V R E N T E V I P S K G C L K A G G G C Y P H H N G V F F 360

KBLV G 180 E S S R P D V S C D I F T T S K G K K R A T K D G K L C G F V D E R G L Y K S L K G A C K L K C G I S G M R L M D G S W V S I Q N H D A K W C S F N D L V N I H D F H S D E I E H L V A E E L V K K R E E C L D A L E S I M M T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N K T L M E A D A H Y K S I R D N T E I I P S K G C L K A G G G C Y P H H N G V F F 359

EBLV2 G 181 E N P N T G M S C D I F T T S K G K K A T K D G K L C G F V D E R G L Y K S L K G A C K L K C G I S G M R L M D G S W V S I Q N H E A K W C S F D L V N I H D F H S D E I E H L V A E E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N K T L M E A D A H Y K S I R E N T E I I P S K G C L M A G G R C Y P H H N G V F F 360

KHLV G 181 E N T K T G V S C D I F T T S K G K K A T K D G K L C G F V D E R G L Y K S L K G S L K L K G V S L R L M D G S W V S I Q N H E A K W C P D L V N V H D F H S D E I E H L I V E E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N K T L M E A D A H Y K S I R N N T E V I I P S K G C L M A G G R C Y P H H N G V F F 360

BBLV G 181 E N Q K P G M S C D I F T T S K G K K A T K N G K M C G F V D E R G L Y K S L K G A C K L K C G V S L R L M D G S W V S V Q N P E D A K W C S F D L V N I H D F H S D E I E H L I V E E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N K T L M E A D A H Y K S I R O N T E I I P S K G C L M A G G R C Y P H H N G V F F 360

IRKV G 181 E K E L S M S C D I F V S S K G K K A T K D G R L C G F V D E R G L Y K S L K G A C K L K C G M A G M R L M D G S W V S L Q R A D A P E W C P F G L V N V H D F H S D E I A H F V E E L I K K R E E C L D L E T I L T T K S I S F R R L S H R K L V P G L K A Y T I I N N T L M E A E A H Y K S I R E N K E I I P S K G C L K A G G R C H P H Y D I F F 360

TWBLV G 181 K D P R L N L A D I F V N S K G K M A M Q G V C G F I D E R G L Y K S L K G A C K L K C G I S G I L R D V G S W S I Q R K N P P K P S F G D L V N I H D F R T E E I E H L I M E D L V K K R E E C L D A L E T I M S T K T I S F R K L S H F R K L V P G F G K A Y T I I N K T L M E A D A H Y S I R N N T E V I I P S K G C L R I G G Y C H P H Y D I F F 360

DUVV G 181 E S S N P G I S C D I F T T S R M S K K A T K D G Q L C G F V D E R G L Y K S L K G A C R L R L C G I S G L R L M D G S W V S L P Q V N N S E W C S F D L V N I H D F H S D E I E H L V A E L V K K R E E C L D A L E T I L F T K S I S F R R L S H L R K L V P G F G K A Y T I I N R T L M E A E A H Y K S V R E N K E I I P S K G C L K A G G R C Y P H H N G I F F 360

EBLV1 G 181 E N P K P G L S C D I F T T S K G K K A T K D G R L C G F V D E R G L Y K S L K G A C Q R L C G V P M R L M D G S W V S L Q K T E A P E W C S F D L V N V H D F H T D E I E H L V E E L V K K R E E C L D A L E T I I T T K S I S F R R L S H R K L V P G F G K A Y T I I N K T L M E A D A H Y K S V R E N K E I I P S K G C L M A G G R C H P H Y S I F F 360

MOKV G 181 E D P S L S L V C D I F T S S N G K K A M G S R I C G F K D E R G F Y R S L K G A C K L T C G R P I R L F D G T W S F T K P D V H W C T F N D L I N I H D R L D E I E H L I V E D I I K K R E E C L D L E T L M S O S V S F R R L S H F R K L V P G F G K A Y T I L N G S L M E T N V Y Y K R V D K N A D I L P S K G C L K V G Q Q M E P V K G V L F 360

LBV G 181 E D P N L S L I C D I F V T S T A R K A M G S R M G F T D E R G F Y R T L K G A C K L T C G K P L R L F D G T W S F T R P E I H V W C S F D L V N V H N N R I D E I E H L I V D D I R K R E E C L D L E T V L M S K S L S F R R L S H F R K L V P G F G K A Y T I L N G S L M E T N V Y Y K R V D R N E E I I P S K G C L K N N K Q M E S D T G V F F 360

MOKV G 181 D D A N V R L T C D I F V T S T G K S M N G S K M G E T D E R G L Y R T L K G A C K L T C G K P L R L F D G T W I S I T R P E I V M W C S F N D L V N V H N N R V D E I E H L I V G D I R R R E E C L D L E T V L M S K S V S F R R L S H F R K L V P G F G K A Y T I A N G S L M E T N V Y Y K R V D R N E E I I P S K G C L K L N D K L N P E N G V F F 360

SHBV G 181 E S E N I R S A C N L F S T S R G K L V R N R T S T G I I D E R G L F R S V K G A C K I I C G R O G I R L V D G T W M S F R Y S E Y L P V C S R S D I N T H D I K V D E L A N I V L D I R R R E E C L D L E T L M S G S V S F R R L S H F R K L V P G S G K A Y S I N G T L M E S D A H Y I K V E N N S E V I P H K G C L M V G G K Y E P V N D V Y F 360

WCV G 181 E D E G R G I T C D I F Q A S T G I L L K N G S K V C G Q D E R G L F R S I K G A C K M I C G K S G V R L Y D G T W V S Y N S V D N L M C R S R K M V N K H T V K L D N I E S I V R D I K K R E E C L D A L E V M L T R S I S F R K L S L F R K V P G Q G V Y Y T M I N N T M E A T G H Y K S V D N N T D I L P N P I C L M V D G K G H G Y D V L F 360

IKoma G 181 Y E E S R G I T C D I F Q S T G R L F F K K D Q V C G I O D E R G M K S T R G A C K M T I C G K S V R L Y D G T W I S Y N T I D N L K V G P R S A M V N H T T K L B A L E A V R D L V K K R E E C L N A F E E I I T N S I S F R K M S L F R K M P S G S L V Y T M I N K T L M E A H G H Y K S V N S E I L P T I D L L V K G K Y Q D H D V L F 360

LLEBV G 181 Y E E S R G I T C D I F Q S T G R L F F K K D Q V C G I O D E R G M K S T R G A C K M T I C G K S V R L Y D G T W I S Y N T I D N L K V G P R S A M V N H T T K L B A L E A V R D L V K K R E E C L N A F E E I I T N S I S F R K M S L F R K M P S G S L V Y T M I N K T L M E A H G H Y K S V N S E I L P T I D L L V K G K Y Q D H D V L F 360

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530

RABV G 361 N G I I L G P D G N V L I P E M O S S L L Q Q H M E L L V S S V I P L M H P L A D P S T V F K N G D E A E D F V E V H L P D V H E R I S G V D L G L P N W G K V L L S A G A L T A L M L I F L M . . . . . T W R R V N R . . . . . S E P T O H N L R G T G R E V S V T P O S G K I I S S W E S Y K S G G E T G L . . . . . 505

ABL V G 361 N G I I L G P D G Q V L I P E M O S S L L Q H D T E L L E S S V I P L I H P L A D P S T I F R G D D E A E G I E V H L P D I Q K Q V S G I D L G L S E W E R Y L I G I S A I I L F I L A I I F T . . . . . I C R R R C K . . . . . R K K I R T D H I E L D R K V S V T S O S G K S I P S W E S Y K S R O G H S R S . . . . . 506

GBL V G 361 N G I I L G P D G H V L I P E M O S S L L Q H M E L L E S S M I P L M H P L A D P S T V F R G D D E A E D F V E V H L P D V Q K I S G V D L G L S E W E R Y L L I G V A A L G L F A F A I I L A . . . . . V C G R R G R . . . . . R K R T P S D P M E M I R K V S V T S O S G K M P S W E S Y K N G N G S R L G V . . . . . 507

ARAV G 361 N G I I L S P D G H V L I P E M O S A L L Q Q H I E L L E S S V I P L R H P L A D P S T V F K G D D E A E E F V E V H L P D T Q K I S G I D L G L P E W K R Y L L M G S A I G F L A I T I I L A . . . . . V C G R R I K R . . . . . R K S K P N P V E L I R K V S V T S O S G R A I P S W E S Y K V K T G D Q P Q V . . . . . 507

KBLV G 360 N G I I L S P E H V L I P E M O S A L L Q Q H I E L L E S S V I P L M H P L A D P S T V F K G D D E A E D F V E V H L P D V Q K I S G I D L G L P E W K R Y L I G V S A L A L L A L A I F I A . . . . . A C C R R V K R . . . . . R R K A K P N P V E L I R K V S V T S O S G R I P S W E S Y K G G A G O Q S O A . . . . . 508

EBLV2 G 361 N G I I L S P D G H V L I P E M O S A L L Q Q H I E L L E S S V I P L M H P L A D P S T I F K K D G A E D F V E V H L P D V Q K I S G I D L G L P E W K R Y L I G V S A L A L L A L M I F I A . . . . . A C C R R V K R . . . . . R K R A K P N P V E L I R K V S V T S O S G R I P S W E S Y K V E T G Q Q S . . . . . 506

KHLV G 361 N G I I L S P D G H V L I P E M O S A L L Q Q H I E L L E S S V I P L M H P L A D P S T V F K G D D E A E D F V E V H L P D V Q K I S G I D L G L P E W K R Y L I G V A A L T L F A L T I F V V . . . . . V C O R R V R R . . . . . R E R A K P N P V E L I R K V S V T S O S G K V I P S W E S Y K V E A E G Q S A . . . . . 507

BBLV G 361 N G I I L S P D G H V L I P E M O S A L L Q Q H I E L L E S S V I P L M H P L A D P S T A L K G G D A E D F V E I H L P D V Q K I S G I D L G L P E W K R Y L L M G V S A L A L L A L T I I L A . . . . . T O C K R I R R . . . . . R K K M K S P V E L I R K V S V T S O S G K V P S W E S Y K V D A G G Q A . . . . . 505

IRKV G 361 N G I I L G P N D V L I P E M O S S L L Q Q H I E L L E S S M I P L R H P L A D S S A I F R S D N E A E D F V D V H L P D T D Q K V S D I D L G F P E W K R Y L I G V S A I A L F L A I I I A . . . . . V C O R K F R K . . . . . R K R P K P G I E L V R K V S V T S O S G K V P S W E S Y K E G A T S Q P . . . . . 505

TWBLV G 361 N G I I L S P O G D V L I P E M O S A L L Q Q H V E L L E S S V I P L R H P L A D P S A T L R E S N E A D F V E I H L P A V Q K H S D I S L G L P E W K H Y F Y I I A S L L A F L A F A I I A A . . . . . M F R R F K R . . . . . R K K P R P N S V E L V R R T S V T S V S G R P V H S W E S Y K T G Q V A P E F V P P H D T P N S P S R I H T . . . . . 523

DUVV G 361 N G I I L G P O G E I L I P E M O S A L L Q Q H I E L L E S S V I P L K H P L A D P S T V F K N D D E A E S F V D V H L P D T N Q K I S G I D L G L P E W K R Y L I G V S A V A L L A L S I I I A . . . . . V C O K F R K . . . . . R K S K P G P V E L T R K V S I S K G N G P V P S W E S Y K E G T T G V R N T T P S T R E . . . . . 514

EBLV1 G 361 N G I I L S P O G D V L I P E M O S A L L Q Q H I E L L E S S M I P L R H P L A D P S T V F K R D D E A E D F V E V H L P D T D K L I S G I D L G F P E W K R Y L I G I S V L L A L L A I I T A . . . . . A C C K F R R . . . . . R R R P K P N I E L I R K V S V T S O S G R A I P S W E S Y K V G A T G E S . . . . . 505

MOKV G 361 N G I I K G P D G R I L I P E M O S E O L K Q H M D L L K A A F P L R H P L I S R E A V F K K D G A D D F V D V H M P D I Q K L V S D V D L G L P N S F F A L I G A S V A I L L V C L L R . . . . . V C O K R V R . . . . . R R S G R A T Q E I P L S F P S A P V P R A V S S W E S Y K G L P G T . . . . . 503

LBV G 361 N G I I K G P D G R I L I P E M O S E O L K Q H M D L L K A A F P L R H P L I D K A S V F K K D G A D D F V D V H M P D I Q K L V S D V D L G L P N S F F A L I G A S V A I L L V C L L R . . . . . M O C K M R R . . . . . R S S V R D Q V A P P S L S T P S K S K V S S W E S Y K G T S S V . . . . . 503

MOKV G 361 N G I I K G P D G R I L I P E M O S E O L K Q H M D L L K A S F P L R H P L I D O T S I F K K D G E A D D F V D V H M P D P H K S I S N I D L G P D W G L F A M I G G T V A F L I L V C L L C . . . . . T O C K R R R . . . . . R N S R K P S E Q T P K I S S T P P S G T K V I S W E S Y K G T S S V . . . . . 503

SHBV G 361 N G I I R D S N N Q I L I P E M O S S L L R H V D L L K A N I V F F R H P M L L R S F T S D T E I V E F V N P H L O D T K L V S D M D L G L S D W K R Y L L I G S L A V G G V A V L I G . . . . . T C G L C R A G R N R T I R S N H R S I S H D V F H K D K V I I S W E S Y K G Q T A Q . . . . . 506

WCV G 361 N G I I R D S N K I L I P E M O S H L L R D L L L K R N S I P W R H P L V H Y P D D T D P S S E T A E I Q L H M R P A V T S D I D F G L S S W K R L I F V A C L I L G L L I L W V I K Y S F K V Y R V M T K . . . . . K R S R R K M O D I L P D P I R S V G G N Q L S W E S Y K N S T N L . . . . . 505

IKoma G 361 N G I I R D S N K I L I P E M O S H L L R D L L L K R N S I P W R H P L V H Y P D D T D P S S E T A E I Q L H M R P A V T S D I D F G L S S W K R L I F V A C L I L G L L I L W V I K Y S F K V Y R V M T K . . . . . K R S R R K M O D I L P D P I R S V G G N Q L S W E S Y K N S T N L . . . . . 506

LLEBV G 361 N G I I R D S N K I L I P E M O S H L L R D L L L K R N S I P W R H P L V H Y P D D T D P S S E T A E I Q L H M R P A V T S D I D F G L S S W K R L I F V A C L I L G L L I L W V I K Y S F K V Y R V M T K . . . . . K R S R R K M O D I L P D P I R S V G G N Q L S W E S Y K N S T N L . . . . . 506

Annexe 2. Aligement des séquences de LYSV G

# Bibliographie

- Abou-Hamdan, Abbas et al. "Monomeric Intermediates Formed by Vesiculovirus Glycoprotein during Its Low-pH-induced Structural Transition." *Journal of molecular biology* vol. 430,12 (2018): 1685-1695. doi:10.1016/j.jmb.2018.04.015
- Akira, Shizuo et al. "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* vol. 124,4 (2006): 783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Albertini, Aurélie A et al. "Characterization of monomeric intermediates during VSV glycoprotein structural transition." *PLoS pathogens* vol. 8,2 (2012): e1002556. doi:10.1371/journal.ppat.1002556
- Albertini, Aurélie A V et al. "Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex." *Science (New York, N.Y.)* vol. 313,5785 (2006): 360-3. doi:10.1126/science.1125280
- Albertini, Aurélie et al. "Structure and working of viral fusion machinery." *Current topics in membranes* vol. 68 (2011): 49-80. doi:10.1016/B978-0-12-385891-7.00003-9
- Aréchiga Ceballos, Nidia et al. "Novel lyssavirus in bat, Spain." *Emerging infectious diseases* vol. 19,5 (2013): 793-5. doi:10.3201/eid1905.121071
- Assenberg, R et al. "Genomics and structure/function studies of Rhabdoviridae proteins involved in replication and transcription." *Antiviral research* vol. 87,2 (2010): 149-61. doi:10.1016/j.antiviral.2010.02.322
- Backovic, Marija et al. "Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 106,8 (2009): 2880-5. doi:10.1073/pnas.0810530106 (A)
- Backovic, Marija, and Theodore S Jardetzky. "Class III viral membrane fusion proteins." *Current opinion in structural biology* vol. 19,2 (2009): 189-96. doi:10.1016/j.sbi.2009.02.012
- Backovic, Marija, and Thomas Krey. "Stable Drosophila Cell Lines: An Alternative Approach to Exogenous Protein Expression." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 1350 (2016): 349-58. doi:10.1007/978-1-4939-3043-2\_17
- Badrane, H et al. "Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity." *Journal of virology* vol. 75,7 (2001): 3268-76. doi:10.1128/JVI.75.7.3268-3276.2001
- Badrane, H, and N Tordo. "Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders." *Journal of virology* vol. 75,17 (2001): 8096-104. doi:10.1128/jvi.75.17.8096-8104.2001
- Baker, K A et al. "Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion." *Molecular cell* vol. 3,3 (1999): 309-19. doi:10.1016/s1097-2765(00)80458-x
- Banyard, Ashley C et al. "Bats and lyssaviruses." *Advances in virus research* vol. 79 (2011): 239-89. doi:10.1016/B978-0-12-387040-7.00012-3
- Banyard, A. C., & Fooks, A. R. "Rabies and the Lyssaviruses." *Reference Module in Life Sciences* (2019). doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.20936-9
- Banyard, Ashley C et al. "Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat." *Viruses* vol. 6,8 2974-90. 4 Aug. 2014, doi:10.3390/v6082974
- Banyard, Ashley C et al. "Rabies and Other Lyssaviruses". *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*, Academic Press (2021) doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20936-9.
- Bao, Huan et al. "Exocytotic fusion pores are composed of both lipids and proteins." *Nature structural & molecular biology* vol. 23,1 (2016): 67-73. doi:10.1038/nsmb.3141
- Baquero, Eduard et al. "Recent mechanistic and structural insights on class III viral fusion glycoproteins." *Current opinion in structural biology* vol. 33 (2015): 52-60. doi:10.1016/j.sbi.2015.07.011 (A)
- Baquero, Eduard et al. "Structural intermediates in the fusion-associated transition of vesiculovirus glycoprotein." *The EMBO journal* vol. 36,5 (2017): 679-692. doi:10.15252/embj.201694565
- Baquero, Eduard et al. "Structure of the low pH conformation of Chandipura virus G reveals important features in the evolution of the vesiculovirus glycoprotein." *PLoS pathogens* vol. 11,3 e1004756. 24 Mar. 2015, doi:10.1371/journal.ppat.1004756 (B)

- Barik, S, and A K Banerjee. "Sequential phosphorylation of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus by cellular and viral protein kinases is essential for transcription activation." *Journal of virology* vol. 66,2 (1992): 1109-18. doi:10.1128/JVI.66.2.1109-1118.1992
- Barrantes, Francisco J. "The constellation of cholesterol-dependent processes associated with SARS-CoV-2 infection." *Progress in lipid research* vol. 87 (2022): 101166. doi:10.1016/j.plipres.2022.101166
- Barrett, Chelsea T, and Rebecca Ellis Dutch. "Viral Membrane Fusion and the Transmembrane Domain." *Viruses* vol. 12,7 693. 27 Jun. 2020, doi:10.3390/v12070693
- Basak, Soumen et al. "Reviewing Chandipura: a vesiculovirus in human epidemics." *Bioscience reports* vol. 27,4-5 (2007): 275-98. doi:10.1007/s10540-007-9054-z
- Bastos, Victor et al. "Neuroimmunology of rabies: New insights into an ancient disease." *Journal of medical virology* vol. 95,10 (2023): e29042. doi:10.1002/jmv.29042
- Beilstein, Frauke et al. "Identification of a pH-Sensitive Switch in VSV-G and a Crystal Structure of the G Pre-fusion State Highlight the VSV-G Structural Transition Pathway." *Cell reports* vol. 32,7 (2020): 108042. doi:10.1016/j.celrep.2020.108042
- Belot, Laura et al. "Crystal structure of Mokola virus glycoprotein in its post-fusion conformation." *PLoS pathogens* vol. 16,3 e1008383. 9 Mar. 2020, doi:10.1371/journal.ppat.1008383
- Belot, Laura et al. "Structural and cellular biology of rhabdovirus entry." *Advances in virus research* vol. 104 (2019): 147-183. doi:10.1016/bs.aivir.2019.05.003
- Ben Hamed, Sabine et al. "Toward the Development of a Pan-Lyssavirus Vaccine." *Viruses* vol. 16,7 1107. 10 Jul. 2024, doi:10.3390/v16071107
- Bender, Ruben R et al. "Receptor-Targeted Nipah Virus Glycoproteins Improve Cell-Type Selective Gene Delivery and Reveal a Preference for Membrane-Proximal Cell Attachment." *PLoS pathogens* vol. 12,6 e1005641. 9 Jun. 2016, doi:10.1371/journal.ppat.1005641
- Benhaim, M A et al. "Structural monitoring of a transient intermediate in the hemagglutinin fusion machinery on influenza virions." *Science advances* vol. 6,18 eaaz8822. 29 Apr. 2020, doi:10.1126/sciadv.aaz8822
- Beniac, D.R.; Booth, T.F. Structure of the Ebola virus glycoprotein spike within the virion envelope at 11 Å resolution. *Sci. Rep.* 2017, 7, 46374.
- Benmansour, A et al. "Antigenicity of rabies virus glycoprotein." *Journal of virology* vol. 65,8 (1991): 4198-203. doi:10.1128/JVI.65.8.4198-4203.1991
- Benton, Donald J et al. "Influenza hemagglutinin membrane anchor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 115,40 (2018): 10112-10117. doi:10.1073/pnas.1810927115
- Benton, Donald J et al. "Structural transitions in influenza haemagglutinin at membrane fusion pH." *Nature* vol. 583,7814 (2020): 150-153. doi:10.1038/s41586-020-2333-6
- Bieniasz, Paul D. "Late budding domains and host proteins in enveloped virus release." *Virology* vol. 344,1 (2006): 55-63. doi:10.1016/j.virol.2005.09.044
- Bishnoi, Suman et al. "Oncotargeting by Vesicular Stomatitis Virus (VSV): Advances in Cancer Therapy." *Viruses* vol. 10,2 90. 23 Feb. 2018, doi:10.3390/v10020090
- Black, B L et al. "Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on host-directed translation in vivo." *Journal of virology* vol. 68,1 (1994): 555-60. doi:10.1128/JVI.68.1.555-560.1994
- Blevins, Tamara P et al. "Correlation between herpes simplex virus neutralizing antibody titers determined by ELVIS cell and traditional plaque reduction assays." *PloS one* vol. 14,4 e0214467. 4 Apr. 2019, doi:10.1371/journal.pone.0214467
- Blondel, Danielle et al. "Resistance to Rhabdoviridae Infection and Subversion of Antiviral Responses." *Viruses* vol. 7,7 3675-702. 7 Jul. 2015, doi:10.3390/v7072794
- Blue, Clare E et al. "The relevance of complement to virus biology." *Virology* vol. 319,2 (2004): 176-84. doi:10.1016/j.virol.2003.11.029
- Böttcher-Friebertshäuser, Eva et al. "Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium." *Pathogens and disease* vol. 69,2 (2013): 87-100. doi:10.1111/2049-632X.12053
- Böttcher-Friebertshäuser, Eva et al. "The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity." *Current topics in microbiology and immunology* vol. 385 (2014): 3-34. doi:10.1007/82\_2014\_384
- BOULGER, L R, and J S PORTERFIELD. "Isolation of a virus from Nigerian fruit bats." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 52,5 (1958): 421-4. doi:10.1016/0035-9203(58)90127-5
- Bournazos, Stylianos et al. "Fc-optimized antibodies elicit CD8 immunity to viral respiratory infection." *Nature* vol. 588,7838 (2020): 485-490. doi:10.1038/s41586-020-2838-z

- Bournazos, Stylianos, and Jeffrey V Ravetch. "Fcγ Receptor Function and the Design of Vaccination Strategies." *Immunity* vol. 47,2 (2017): 224-233. doi:10.1016/j.immuni.2017.07.009
- Bouzamondo, E et al. "Alteration of potassium-evoked 5-HT release from virus-infected rat cortical synaptosomes." *Neuroreport* vol. 4,5 (1993): 555-8. doi:10.1097/00001756-199305000-00023
- Bressanelli, Stéphane et al. "Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation." *The EMBO journal* vol. 23,4 (2004): 728-38. doi:10.1038/sj.emboj.7600064
- Breyton, Cécile et al. "Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins." *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* vol. 1861,5 (2019): 939-957. doi:10.1016/j.bbmem.2019.02.003
- Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S., Vornrhein C., Womack T.O. (2017). BUSTER version X.Y.Z. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
- Bullough, P A et al. "Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion." *Nature* vol. 371,6492 (1994): 37-43. doi:10.1038/371037a0
- Bunschoten, H et al. "Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein." *The Journal of general virology* vol. 70 (Pt 2) (1989): 291-8. doi:10.1099/0022-1317-70-2-291
- Burton, D R et al. "A model for neutralization of viruses based on antibody coating of the virion surface." *Current topics in microbiology and immunology* vol. 260 (2001): 109-43. doi:10.1007/978-3-662-05783-4\_7
- Burton, Dennis R. "Antiviral neutralizing antibodies: from in vitro to in vivo activity." *Nature reviews. Immunology* vol. 23,11 (2023): 720-734. doi:10.1038/s41577-023-00858-w
- Buzon, Victor et al. "Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions." *PLoS pathogens* vol. 6,5 e1000880. 6 May. 2010, doi:10.1371/journal.ppat.1000880
- Cai, Kun et al. "Fine mapping and interaction analysis of a linear rabies virus neutralizing epitope." *Microbes and infection* vol. 12,12-13 (2010): 948-55. doi:10.1016/j.micinf.2010.06.005
- Caillet-Saguy, Célia et al. "Strategies to interfere with PDZ-mediated interactions in neurons: What we can learn from the rabies virus." *Progress in biophysics and molecular biology* vol. 119,1 (2015): 53-9. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.007
- Calder, Lesley J, and Peter B Rosenthal. "Cryomicroscopy provides structural snapshots of influenza virus membrane fusion." *Nature structural & molecular biology* vol. 23,9 (2016): 853-8. doi:10.1038/nsmb.3271
- Callaway, Heather M et al. "Structure of the rabies virus glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody." *Science advances* vol. 8,24 (2022): eabp9151. doi:10.1126/sciadv.abp9151
- Campanacci, Valérie et al. "Selection and Characterization of Artificial Proteins Targeting the Tubulin α Subunit." *Structure (London, England : 1993)* vol. 27,3 (2019): 497-506.e4. doi:10.1016/j.str.2018.12.001
- Carneiro, Fabiana A et al. "Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation." *The Journal of biological chemistry* vol. 278,16 (2003): 13789-94. doi:10.1074/jbc.M210615200
- Castel, Guillaume et al. "Peptides that mimic the amino-terminal end of the rabies virus phosphoprotein have antiviral activity." *Journal of virology* vol. 83,20 (2009): 10808-20. doi:10.1128/JVI.00977-09
- Ceccaldi, P E et al. "Rabies virus selectively alters 5-HT1 receptor subtypes in rat brain." *European journal of pharmacology* vol. 245,2 (1993): 129-38. doi:10.1016/0922-4106(93)90120-x
- Chae, Pil Seok et al. "Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins." *Nature methods* vol. 7,12 (2010): 1003-8. doi:10.1038/nmeth.1526
- Chandramouli, Sumana et al. "Structure of HCMV glycoprotein B in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody." *Nature communications* vol. 6 8176. 14 Sep. 2015, doi:10.1038/ncomms9176
- Chandran, Kartik et al. "Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection." *Science (New York, N.Y.)* vol. 308,5728 (2005): 1643-5. doi:10.1126/science.1110656
- Chang, Ding-Kwo et al. "Membrane interaction and structure of the transmembrane domain of influenza hemagglutinin and its fusion peptide complex." *BMC biology* vol. 6 2. 15 Jan. 2008, doi:10.1186/1741-7007-6-2
- Chao, Tzu-Yuan et al. "SYN023, a novel humanized monoclonal antibody cocktail, for post-exposure prophylaxis of rabies." *PLoS neglected tropical*

diseases vol. 11,12 e0006133. 20 Dec. 2017, doi:10.1371/journal.pntd.0006133

Chelbi-Alix, Mounira K et al. "Rabies viral mechanisms to escape the IFN system: the viral protein P interferes with IRF-3, Stat1, and PML nuclear bodies." *Journal of Interferon & Cytokine Research* : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research vol. 26,5 (2006): 271-80. doi:10.1089/jir.2006.26.271

Chen, Bing, and James J Chou. "Structure of the transmembrane domain of HIV-1 envelope glycoprotein." *The FEBS journal* vol. 284,8 (2017): 1171-1177. doi:10.1111/febs.13954

Chen, Bing. "Molecular Mechanism of HIV-1 Entry." *Trends in microbiology* vol. 27,10 (2019): 878-891. doi:10.1016/j.tim.2019.06.002

Chen, Zhiqiang et al. "Visualizing the RNA molecule in the bacterially expressed vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex." *Structure (London, England : 1993)* vol. 12,2 (2004): 227-35. doi:10.1016/j.str.2004.01.001

Chenik, M et al. "Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism." *Journal of virology* vol. 69,2 (1995): 707-12. doi:10.1128/JVI.69.2.707-712.1995

Chenik, M et al. "Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein." *Journal of virology* vol. 72,3 (1998): 1925-30. doi:10.1128/JVI.72.3.1925-1930.1998

Chernomordik, L V et al. "The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation." *The Journal of cell biology* vol. 140,6 (1998): 1369-82. doi:10.1083/jcb.140.6.1369

Chernomordik, Leonid V, and Michael M Kozlov. "Mechanics of membrane fusion." *Nature structural & molecular biology* vol. 15,7 (2008): 675-83. doi:10.1038/nsmb.1455

Chevrel, Anne et al. "Alpha repeat proteins ( $\alpha$ Rep) as expression and crystallization helpers." *Journal of structural biology* vol. 201,2 (2018): 88-99. doi:10.1016/j.jsb.2017.08.002

Chevrel, Anne et al. "Specific GFP-binding artificial proteins ( $\alpha$ Rep): a new tool for in vitro to live cell applications." *Bioscience reports* vol. 35,4 e00223. 12 Jun. 2015, doi:10.1042/BSR20150080

Chlanda, Petr, and Joshua Zimmerberg. "Protein-lipid interactions critical to replication of the influenza A virus." *FEBS letters* vol. 590,13 (2016): 1940-54. doi:10.1002/1873-3468.12118

Chong, L D, and J K Rose. "Interactions of normal and mutant vesicular stomatitis virus matrix proteins with the plasma membrane and nucleocapsids." *Journal of virology* vol. 68,1 (1994): 441-7. doi:10.1128/JVI.68.1.441-447.1994

Ci, Yali et al. "Vesicular stomatitis virus G protein transmembrane region is crucial for the hemi-fusion to full fusion transition." *Scientific reports* vol. 8,1 10669. 13 Jul. 2018, doi:10.1038/s41598-018-28868-y

Clague, M J et al. "Gating kinetics of pH-activated membrane fusion of vesicular stomatitis virus with cells: stopped-flow measurements by dequenching of octadecylrhodamine fluorescence." *Biochemistry* vol. 29,5 (1990): 1303-8. doi:10.1021/bi00457a028

Cleverley, D Z, and J Lenard. "The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 95,7 (1998): 3425-30. doi:10.1073/pnas.95.7.3425

Cohen, F S, and G B Melikyan. "The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement." *The Journal of membrane biology* vol. 199,1 (2004): 1-14. doi:10.1007/s00232-004-0669-8

Connor, John H et al. "Role of residues 121 to 124 of vesicular stomatitis virus matrix protein in virus assembly and virus-host interaction." *Journal of virology* vol. 80,8 (2006): 3701-11. doi:10.1128/JVI.80.8.3701-3711.2006

Cooper, Rebecca S et al. "Structural basis for membrane anchoring and fusion regulation of the herpes simplex virus fusogen gB." *Nature structural & molecular biology* vol. 25,5 (2018): 416-424. doi:10.1038/s41594-018-0060-6

Coulon, P et al. "An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons in vivo and in vitro." *Journal of virology* vol. 72,1 (1998): 273-8. doi:10.1128/JVI.72.1.273-278.1998

Coutard, B et al. "The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade." *Antiviral research* vol. 176 (2020): 104742. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104742

Crampon, E et al. "New insight into flavivirus maturation from structure/function studies of the yellow fever virus envelope protein complex." *mBio* vol. 14,5 (2023): e0070623. doi:10.1128/mbio.00706-23

Crimmins, D L et al. "Physical properties of a soluble form of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus at neutral and acidic pH." *Biochemistry* vol. 22,25 (1983): 5790-6. doi:10.1021/bi00294a017

- Cser, L et al. "Neutron small-angle scattering studies of the general structure of the immunoglobulin G molecule." *FEBS letters* vol. 68,2 (1976): 283-7. doi:10.1016/0014-5793(76)80454-1
- Cureton, David K et al. "The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis." *PLoS pathogens* vol. 6,9 e1001127. 30 Sep. 2010. doi:10.1371/journal.ppat.1001127
- Cureton, David K et al. "Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization." *PLoS pathogens* vol. 5,4 (2009): e1000394. doi:10.1371/journal.ppat.1000394
- Dang, Shangyu et al. "Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel." *Nature* vol. 552,7685 (2017): 426-429. doi:10.1038/nature25024
- Das, Dibyendu Kumar et al. "Direct Visualization of the Conformational Dynamics of Single Influenza Hemagglutinin Trimers." *Cell* vol. 174,4 (2018): 926-937.e12. doi:10.1016/j.cell.2018.05.050
- De Benedictis, Paola et al. "Development of broad-spectrum human monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis." *EMBO molecular medicine* vol. 8,4 (2016): 407-21. doi:10.15252/emmm.201505986
- de Melo, Guilherme Dias et al. "A combination of two human monoclonal antibodies cures symptomatic rabies." *EMBO molecular medicine* vol. 12,11 (2020): e12628. doi:10.15252/emmm.202012628
- de Melo, Guilherme Dias et al. "Monoclonal antibodies against rabies: current uses in prophylaxis and in therapy." *Current opinion in virology* vol. 53 (2022): 101204. doi:10.1016/j.coviro.2022.101204
- de Vries, Maren et al. "A cholesterol consensus motif is required for efficient intracellular transport and raft association of a group 2 HA from influenza virus." *The Biochemical journal* vol. 465,2 (2015): 305-14. doi:10.1042/BJ20141114
- Dennison, S Moses et al. "VSV transmembrane domain (TMD) peptide promotes PEG-mediated fusion of liposomes in a conformationally sensitive fashion." *Biochemistry* vol. 41,50 (2002): 14925-34. doi:10.1021/bi0203233
- DePolo, N J et al. "VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum." *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 2,3 (2000): 218-22. doi:10.1006/mthe.2000.0116
- Desfosses, Ambroise et al. "Self-organization of the vesicular stomatitis virus nucleocapsid into a bullet shape." *Nature communications* vol. 4 (2013): 1429. doi:10.1038/ncomms2435
- Dietzgen, Ralf G et al. "The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins." *Virus research* vol. 227 (2017): 158-170. doi:10.1016/j.virusres.2016.10.010
- Dietzschold B, Rupprecht CE, Fu ZF, Koprowski H: Rhabdoviruses. In Fields BN, and Knipe DM, and Howley PM, eds. *Virology*. . Lippincott-Raven Publishers; 1996:1137–1159
- Dietzschold, B et al. "Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 84,24 (1987): 9165-9. doi:10.1073/pnas.84.24.9165
- Dietzschold, B et al. "Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine." *Journal of virology* vol. 64,8 (1990): 3804-9. doi:10.1128/JVI.64.8.3804-3809.1990
- Dietzschold, Bernhard et al. "Concepts in the pathogenesis of rabies." *Future virology* vol. 3,5 (2008): 481-490. doi:10.2217/17460794.3.5.481
- DiLillo, David J, and Jeffrey V Ravetch. "Differential Fc-Receptor Engagement Drives an Anti-tumor Vaccinal Effect." *Cell* vol. 161,5 (2015): 1035-1045. doi:10.1016/j.cell.2015.04.016
- Ding, Haitao et al. "Crystal structure of the oligomerization domain of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus." *Journal of virology* vol. 80,6 (2006): 2808-14. doi:10.1128/JVI.80.6.2808-2814.2006
- Dolan, Kimberly A et al. "Structure of SARS-CoV-2 M protein in lipid nanodiscs." *eLife* vol. 11 e81702. 20 Oct. 2022, doi:10.7554/eLife.81702
- Doms, R W et al. "Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers." *The Journal of cell biology* vol. 105,5 (1987): 1957-69. doi:10.1083/jcb.105.5.1957
- Donnelly, Camilla M et al. "Structural Determination of the Australian Bat Lyssavirus Nucleoprotein and Phosphoprotein Complex." *Viruses* vol. 16,1 (2023): 33. doi:10.3390/v16010033
- Duquerroy, Stéphane et al. "Central ions and lateral asparagine/glutamine zippers stabilize the post-fusion hairpin conformation of the SARS coronavirus spike glycoprotein." *Virology* vol. 335,2 (2005): 276-85. doi:10.1016/j.virol.2005.02.022
- Earnest, James T et al. "Neutralizing antibodies against Mayaro virus require Fc effector functions for protective activity." *The Journal of experimental*

- medicine vol. 216,10 (2019): 2282-2301. doi:10.1084/jem.20190736
- Efrat, Avishay et al. "Point-like protrusion as a prestalk intermediate in membrane fusion pathway." *Biophysical journal* vol. 92,8 (2007): L61-3. doi:10.1529/biophysj.106.103341
- Elegheert, Jonathan et al. "Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins." *Nature protocols* vol. 13,12 (2018): 2991-3017. doi:10.1038/s41596-018-0075-9
- Emsley, P et al. "Features and development of Coot." *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* vol. 66,Pt 4 (2010): 486-501. doi:10.1107/S0907444910007493
- Ertl, Hildegund C J. "New Rabies Vaccines for Use in Humans." *Vaccines* vol. 7,2 54. 20 Jun. 2019, doi:10.3390/vaccines7020054
- Eschli, Bruno et al. "Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins." *Journal of virology* vol. 80,12 (2006): 5897-907. doi:10.1128/JVI.00008-06
- Evans, J S et al. "Antigenic site changes in the rabies virus glycoprotein dictates functionality and neutralizing capability against divergent lyssaviruses." *The Journal of general virology* vol. 99,2 (2018): 169-180. doi:10.1099/jgv.0.000998
- Evans, Jennifer S et al. "Rabies virus vaccines: is there a need for a pan-lyssavirus vaccine?." *Vaccine* vol. 30,52 (2012): 7447-54. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.015
- Fallahi, Firouzeh et al. "Characterization of epitopes on the rabies virus glycoprotein by selection and analysis of escape mutants." *Virus research* vol. 220 (2016): 161-71. doi:10.1016/j.virusres.2016.04.019
- Ferlin, Anna et al. "Characterization of pH-sensitive molecular switches that trigger the structural transition of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the postfusion state toward the prefusion state." *Journal of virology* vol. 88,22 (2014): 13396-409. doi:10.1128/JVI.01962-14
- Finke, Stefan et al. "Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication." *The Journal of general virology* vol. 84,Pt 6 (2003): 1613-1621. doi:10.1099/vir.0.19128-0
- Finkelshtein, Danit et al. "LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 110,18 (2013): 7306-11. doi:10.1073/pnas.1214441110
- Fisher, Christine R et al. "Lyssavirus Vaccine with a Chimeric Glycoprotein Protects across Phylogroups." *Cell reports* vol. 32,3 (2020): 107920. doi:10.1016/j.celrep.2020.107920
- Fisher, Christine R et al. "The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers." *Nature reviews. Microbiology* vol. 16,4 (2018): 241-255. doi:10.1038/nrmicro.2018.11
- Flamand, A et al. "Mechanisms of rabies virus neutralization." *Virology* vol. 194,1 (1993): 302-13. doi:10.1006/viro.1993.1261
- Flood, E A, and D S Lyles. "Assembly of nucleocapsids with cytosolic and membrane-derived matrix proteins of vesicular stomatitis virus." *Virology* vol. 261,2 (1999): 295-308. doi:10.1006/viro.1999.9856
- Folly, Arran J et al. "Incurion of European Bat Lyssavirus 1 (EBLV-1) in Serotine Bats in the United Kingdom." *Viruses* vol. 13,10 1979. 1 Oct. 2021, doi:10.3390/v13101979
- Fooks, Anthony R et al. "Rabies." *Nature reviews. Disease primers* vol. 3 17091. 30 Nov. 2017, doi:10.1038/nrdp.2017.91
- Forthal, Donald N, and Christiane Moog. "Fc receptor-mediated antiviral antibodies." *Current opinion in HIV and AIDS* vol. 4,5 (2009): 388-93. doi:10.1097/COH.0b013e32832f0a89
- Frank, A L et al. "Microneutralization test for influenza A and B and parainfluenza 1 and 2 viruses that uses continuous cell lines and fresh serum enhancement." *Journal of clinical microbiology* vol. 12,3 (1980): 426-32. doi:10.1128/jcm.12.3.426-432.1980
- Fredericksen, B L, and M A Whitt. "Mutations at two conserved acidic amino acids in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect pH-dependent conformational changes and reduce the pH threshold for membrane fusion." *Virology* vol. 217,1 (1996): 49-57. doi:10.1006/viro.1996.0092
- Fritz, Richard et al. "Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion." *The Journal of cell biology* vol. 183,2 (2008): 353-61. doi:10.1083/jcb.200806081
- Fu, Zhen F, and Alan C Jackson. "Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection." *Journal of neurovirology* vol. 11,1 (2005): 101-6. doi:10.1080/13550280590900445
- Funke, Sabrina et al. "Targeted cell entry of lentiviral vectors." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 16,8 (2008): 1427-36. doi:10.1038/mt.2008.128
- Gaddy, Daniel F, and Douglas S Lyles. "Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct



- pathways." *Journal of virology* vol. 79,7 (2005): 4170-9. doi:10.1128/JVI.79.7.4170-4179.2005
- Gallaher, W R et al. "The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor." *BMC microbiology* vol. 1 (2001): 1. doi:10.1186/1471-2180-1-1
- Gao, Jingjing et al. "Structural intermediates in the low pH-induced transition of influenza hemagglutinin." *PLoS pathogens* vol. 16,11 e1009062. 30 Nov. 2020, doi:10.1371/journal.ppat.1009062
- Garry, Courtney E, and Robert F Garry. "Proteomics computational analyses suggest that the bornavirus glycoprotein is a class III viral fusion protein (gamma penetrene)." *Virology journal* vol. 6 145. 18 Sep. 2009, doi:10.1186/1743-422X-6-145
- Gaudier, Martin et al. "Crystal structure of vesicular stomatitis virus matrix protein." *The EMBO journal* vol. 21,12 (2002): 2886-92. doi:10.1093/emboj/cdf284
- Gaudin, Y et al. "Aggregation of VSV M protein is reversible and mediated by nucleation sites: implications for viral assembly." *Virology* vol. 206,1 (1995): 28-37. doi:10.1016/s0042-6822(95)80016-6
- Gaudin, Y et al. "Fatty acylation of rabies virus proteins." *Virology* vol. 184,1 (1991): 441-4. doi:10.1016/0042-6822(91)90866-a
- Gaudin, Y et al. "Identification of amino acids controlling the low-pH-induced conformational change of rabies virus glycoprotein." *Journal of virology* vol. 70,11 (1996): 7371-8. doi:10.1128/JVI.70.11.7371-7378.1996
- Gaudin, Y et al. "Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion." *The Journal of general virology* vol. 80 ( Pt 5) (1999): 1221-1229. doi:10.1099/0022-1317-80-5-1221
- Gaudin, Y et al. "Rabies virus glycoprotein is a trimer." *Virology* vol. 187,2 (1992): 627-32. doi:10.1016/0042-6822(92)90465-2
- Gaudin, Y. "Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones." *Journal of virology* vol. 71,5 (1997): 3742-50. doi:10.1128/JVI.71.5.3742-3750.1997
- Gaudin, Y. "Rabies virus-induced membrane fusion pathway." *The Journal of cell biology* vol. 150,3 (2000): 601-12. doi:10.1083/jcb.150.3.601 (B)
- Gaudin, Y. "Reversibility in fusion protein conformational changes. The intriguing case of rhabdovirus-induced membrane fusion." *Sub-cellular biochemistry* vol. 34 (2000): 379-408. doi:10.1007/0-306-46824-7\_10 A
- Ge, Peng et al. "Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus." *Science (New York, N.Y.)* vol. 327,5966 (2010): 689-93. doi:10.1126/science.1181766
- Gérard, Francine C A et al. "Structure and Dynamics of the Unassembled Nucleoprotein of Rabies Virus in Complex with Its Phosphoprotein Chaperone Module." *Viruses* vol. 14,12 2813. 16 Dec. 2022, doi:10.3390/v14122813
- Gerard, Francine C A et al. "Modular organization of rabies virus phosphoprotein." *Journal of molecular biology* vol. 388,5 (2009): 978-96. doi:10.1016/j.jmb.2009.03.061
- Gibbons, Don L et al. "Visualization of the target-membrane-inserted fusion protein of Semliki Forest virus by combined electron microscopy and crystallography." *Cell* vol. 114,5 (2003): 573-83. doi:10.1016/s0092-8674(03)00683-4
- Gluska, Shani et al. "Rabies Virus Hijacks and accelerates the p75NTR retrograde axonal transport machinery." *PLoS pathogens* vol. 10,8 e1004348. 28 Aug. 2014, doi:10.1371/journal.ppat.1004348
- Gourmelon, P et al. "Sleep alterations in experimental street rabies virus infection occur in the absence of major EEG abnormalities." *Brain research* vol. 554,1-2 (1991): 159-65. doi:10.1016/0006-8993(91)90184-w
- Graham, Stephen C et al. "Rhabdovirus matrix protein structures reveal a novel mode of self-association." *PLoS pathogens* vol. 4,12 (2008): e1000251. doi:10.1371/journal.ppat.1000251
- Green, Todd J et al. "Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex." *Science (New York, N.Y.)* vol. 313,5785 (2006): 357-60. doi:10.1126/science.1126953
- Greenspan, Neil S. "Cohen's Conjecture, Howard's Hypothesis, and Ptashne's Ptruth: an exploration of the relationship between affinity and specificity." *Trends in immunology* vol. 31,4 (2010): 138-43. doi:10.1016/j.it.2010.01.001
- Guardado-Calvo, Pablo, and Félix A Rey. "The Viral Class II Membrane Fusion Machinery: Divergent Evolution from an Ancestral Heterodimer." *Viruses* vol. 13,12 2368. 26 Nov. 2021, doi:10.3390/v13122368
- Guellouz, Asma et al. "Selection of specific protein binders for pre-defined targets from an optimized library of artificial helicoidal repeat proteins (alphaRep)." *PLoS one* vol. 8,8 e71512. 27 Aug. 2013, doi:10.1371/journal.pone.0071512

- Hadpech, Sudarat et al. "Alpha-helical HEAT-like Repeat Proteins ( $\alpha$ Rep) Selected as Interactors of HIV-1 Nucleocapsid Negatively Interfere with Viral Genome Packaging and Virus Maturation." *Scientific reports* vol. 7,1 16335. 27 Nov. 2017, doi:10.1038/s41598-017-16451-w
- Hammond, C, and A Helenius. "Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin." *Science (New York, N.Y.)* vol. 266,5184 (1994): 456-8. doi:10.1126/science.7939687
- Hangartner, Lars et al. "Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum." *Nature reviews. Immunology* vol. 6,3 (2006): 231-43. doi:10.1038/nri1783
- Harbury, P B et al. "A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants." *Science (New York, N.Y.)* vol. 262,5138 (1993): 1401-7. doi:10.1126/science.8248779
- Harrison, Stephen C. "Viral membrane fusion." *Virology* vol. 479-480 (2015): 498-507. doi:10.1016/j.virol.2015.03.043
- Harty, R N et al. "A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 97,25 (2000): 13871-6. doi:10.1073/pnas.250277297
- Hauer, Florian et al. "GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM." *Structure (London, England : 1993)* vol. 23,9 (2015): 1769-1775. doi:10.1016/j.str.2015.06.029
- Heldwein, Ekaterina E et al. "Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1." *Science (New York, N.Y.)* vol. 313,5784 (2006): 217-20. doi:10.1126/science.1126548
- Hellert, Jan et al. "Structure of the prefusion-locking broadly neutralizing antibody RVC20 bound to the rabies virus glycoprotein." *Nature communications* vol. 11,1 596. 30 Jan. 2020, doi:10.1038/s41467-020-14398-7
- Hernández, Javier M, and Benjamin Podbilewicz. "The hallmarks of cell-cell fusion." *Development (Cambridge, England)* vol. 144,24 (2017): 4481-4495. doi:10.1242/dev.155523
- Hernández, Javier M, and Benjamin Podbilewicz. "The hallmarks of cell-cell fusion." *Development (Cambridge, England)* vol. 144,24 (2017): 4481-4495. doi:10.1242/dev.155523
- Herrmann, A et al. "Effect of erythrocyte transbilayer phospholipid distribution on fusion with vesicular stomatitis virus." *Biochemistry* vol. 29,17 (1990): 4054-8. doi:10.1021/bi00469a005
- Hessell, Ann J et al. "Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV." *Nature* vol. 449,7158 (2007): 101-4. doi:10.1038/nature06106
- Hilchey, Shannon P et al. "Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a "vaccinal effect" of rituximab." *Blood* vol. 113,16 (2009): 3809-12. doi:10.1182/blood-2008-10-185280
- Hoffmann, Markus et al. "A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells." *Molecular cell* vol. 78,4 (2020): 779-784.e5. doi:10.1016/j.molcel.2020.04.022
- Höhne, M et al. "Truncation of the human immunodeficiency virus-type-2 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of murine leukemia virus retroviral vector particles." *Virology* vol. 261,1 (1999): 70-8. doi:10.1006/viro.1999.9847
- Horton, Daniel L et al. "Antigenic and genetic characterization of a divergent African virus, Ikoma lyssavirus." *The Journal of general virology* vol. 95, Pt 5 (2014): 1025-1032. doi:10.1099/vir.0.061952-0
- Hu, Shu-Chia et al. "Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan." *Emerging infectious diseases* vol. 24,4 (2018): 782-785. doi:10.3201/eid2404.171696
- Hulswit, Ruben J G et al. "Recent Advances in Bunyavirus Glycoprotein Research: Precursor Processing, Receptor Binding and Structure." *Viruses* vol. 13,2 353. 23 Feb. 2021, doi:10.3390/v13020353
- Huynh, Kevin W et al. "Structure of the full-length TRPV2 channel by cryo-EM." *Nature communications* vol. 7 11130. 29 Mar. 2016, doi:10.1038/ncomms11130
- ICTV, Rhabdovirus mai 2024 : <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae>
- ICTV, Vesiculovirus mai 2024 : <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/vesiculovirus>
- ICTV, Vesiculovirus mai 2024 : <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/lyssavirus>
- Irie, Takashi et al. "Functional analysis of late-budding domain activity associated with the PSAP motif within the vesicular stomatitis virus M protein." *Journal of virology* vol. 78,14 (2004): 7823-7. doi:10.1128/JVI.78.14.7823-7827.2004
- Ivanov, Ivan et al. "Structural insights into the rhabdovirus transcription/replication complex." *Virus*

- research vol. 162,1-2 (2011): 126-37. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.025
- Jacob, Y et al. "Functional interaction map of lyssavirus phosphoprotein: identification of the minimal transcription domains." *Journal of virology* vol. 75,20 (2001): 9613-22. doi:10.1128/JVI.75.20.9613-9622.2001
- Jackson, A. C. (2013). *Rabies: Scientific Basis of the Disease and its Management*. Elsevier Academic Press.
- Jackson, Alan C et al. "Management of rabies in humans." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 36,1 (2003): 60-3. doi:10.1086/344905
- Jaimes, Javier A et al. "Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop." *Journal of molecular biology* vol. 432,10 (2020): 3309-3325. doi:10.1016/j.jmb.2020.04.009 **A**.
- Jaimes, Javier A et al. "Proteolytic Cleavage of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Role of the Novel S1/S2 Site." *iScience* vol. 23,6 (2020): 101212. doi:10.1016/j.isci.2020.101212 **B**.
- Jayakar, H R et al. "Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release." *Journal of virology* vol. 74,21 (2000): 9818-27. doi:10.1128/jvi.74.21.9818-9827.2000
- Jeetendra, E et al. "The membrane-proximal domain of vesicular stomatitis virus G protein functions as a membrane fusion potentiator and can induce hemifusion." *Journal of virology* vol. 76,23 (2002): 12300-11. doi:10.1128/jvi.76.23.12300-12311.2002
- Jeetendra, E et al. "The membrane-proximal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein G ectodomain is critical for fusion and virus infectivity." *Journal of virology* vol. 77,23 (2003): 12807-18. doi:10.1128/jvi.77.23.12807-12818.2003
- Jenni, Simon et al. "Structure of the Vesicular Stomatitis Virus L Protein in Complex with Its Phosphoprotein Cofactor." *Cell reports* vol. 30,1 (2020): 53-60.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.12.024
- Jenni, Simon et al. "Visualizing molecular interactions that determine assembly of a bullet-shaped vesicular stomatitis virus particle." *Nature communications* vol. 13,1 4802. 15 Aug. 2022, doi:10.1038/s41467-022-32223-1
- Johannsdottir, Hrefna Kristin et al. "Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry." *Journal of virology* vol. 83,1 (2009): 440-53. doi:10.1128/JVI.01864-08
- Johnson, Nicholas et al. "The immune response to rabies virus infection and vaccination." *Vaccine* vol. 28,23 (2010): 3896-901. doi:10.1016/j.vaccine.2010.03.039
- Jumper, John et al. "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold." *Nature* vol. 596,7873 (2021): 583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
- Junker, Fabian et al. "Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation." *Frontiers in immunology* vol. 11 1393. 3 Jul. 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.01393
- Kabsch, Wolfgang. "XDS." *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* vol. 66,Pt 2 (2010): 125-32. doi:10.1107/S0907444909047337
- Kadlec, Jan et al. "The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines." *Nature structural & molecular biology* vol. 15,10 (2008): 1024-30. doi:10.1038/nsmb.1484
- Kamerzell, Tim J et al. "Immunoglobulin dynamics, conformational fluctuations, and nonlinear elasticity and their effects on stability." *The journal of physical chemistry. B* vol. 112,10 (2008): 3240-50. doi:10.1021/jp710061a
- Kapoor, Karan et al. "Posttranslational modifications optimize the ability of SARS-CoV-2 spike for effective interaction with host cell receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 119,28 (2022): e2119761119. doi:10.1073/pnas.2119761119
- Katz, Michael et al. "Structure and receptor recognition by the Lassa virus spike complex." *Nature* vol. 603,7899 (2022): 174-179. doi:10.1038/s41586-022-04429-2
- Kawase, Miyuki et al. "Biochemical Analysis of Coronavirus Spike Glycoprotein Conformational Intermediates during Membrane Fusion." *Journal of virology* vol. 93,19 e00785-19. 12 Sep. 2019, doi:10.1128/JVI.00785-19
- Kelley, J M et al. "The glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibody." *Journal of virology* vol. 10,6 (1972): 1231-5. doi:10.1128/JVI.10.6.1231-1235.1972
- Kielian, Margaret et al. "Alphavirus Entry and Membrane Fusion." *Viruses* vol. 2,4 (2010): 796-825. doi:10.3390/v2040796
- Kim, Irene S et al. "Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 114,1 (2017): E28-E36. doi:10.1073/pnas.1618883114 (A)

- a. Kim, Seonhee et al. "Early Transcriptional Changes in Rabies Virus-Infected Neurons and Their Impact on Neuronal Functions." *Frontiers in microbiology* vol. 12 730892. 13 Dec. 2021, doi:10.3389/fmicb.2021.730892 (A)
- b. Kim, Pan Kyeom et al. "A broad-spectrum and highly potent human monoclonal antibody cocktail for rabies prophylaxis." *PLoS one* vol. 16,9 e0256779. 1 Sep. 2021, doi:10.1371/journal.pone.0256779 (B)
- Klasse, P J. "Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives." *Advances in biology* vol. 2014 (2014): 157895. doi:10.1155/2014/157895
- Klasse, Per Johan, and Dennis R Burton. "Antibodies to West Nile virus: a double-edged sword." *Cell host & microbe* vol. 1,2 (2007): 87-9. doi:10.1016/j.chom.2007.04.001
- Klein, Daryl E et al. "Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate." *Journal of virology* vol. 87,4 (2013): 2287-93. doi:10.1128/JVI.02957-12
- Klingen, Yvonne et al. "Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport." *Journal of virology* vol. 82,1 (2008): 237-45. doi:10.1128/JVI.01342-07
- Köhler, G, and C Milstein. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* vol. 256,5517 (1975): 495-7. doi:10.1038/256495a0
- Kotait, Ivanete et al. "Non-human primates as a reservoir for rabies virus in Brazil." *Zoonoses and public health* vol. 66,1 (2019): 47-59. doi:10.1111/zph.12527
- Kuzmin, Ivan V et al. "Possible emergence of West Caucasian bat virus in Africa." *Emerging infectious diseases* vol. 14,12 (2008): 1887-9. doi:10.3201/eid1412.080750
- Kuzmin, P I et al. "A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 98,13 (2001): 7235-40. doi:10.1073/pnas.121191898
- Lafon, M et al. "Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies." *The Journal of general virology* vol. 64 (Pt 4) (1983): 843-51. doi:10.1099/0022-1317-64-4-843
- Lafon, M et al. "Investigation of the antigenic structure of rabies virus glycoprotein by monoclonal antibodies." *Developments in biological standardization* vol. 57 (1984): 219-25.
- Lai, Alex L, and Jack H Freed. "The Interaction between Influenza HA Fusion Peptide and Transmembrane Domain Affects Membrane Structure." *Biophysical journal* vol. 109,12 (2015): 2523-2536. doi:10.1016/j.bpj.2015.10.044
- Lander, Gabriel C, and Robert M Glaeser. "Conquer by cryo-EM without physically dividing." *Biochemical Society transactions* vol. 49,5 (2021): 2287-2298. doi:10.1042/BST20210360
- Lee, J, and B R Lentz. "Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 95,16 (1998): 9274-9. doi:10.1073/pnas.95.16.9274
- Lee, Jeong Hyun et al. "Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer." *Science (New York, N.Y.)* vol. 351,6277 (2016): 1043-8. doi:10.1126/science.aad2450
- Lee, Jinwoo et al. "Ebola virus glycoprotein interacts with cholesterol to enhance membrane fusion and cell entry." *Nature structural & molecular biology* vol. 28,2 (2021): 181-189. doi:10.1038/s41594-020-00548-4
- Lefrancois, L, and D S Lyles. "Antigenic determinants of vesicular stomatitis virus: analysis with antigenic variants." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* vol. 130,1 (1983): 394-8.
- Lefrancois, L, and D S Lyles. "The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. I. Analysis of neutralizing epitopes with monoclonal antibodies." *Virology* vol. 121,1 (1982): 157-67.
- Lefrancois, L, and D S Lyles. "The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. I. Analysis of neutralizing epitopes with monoclonal antibodies." *Virology* vol. 121,1 (1982): 157-67. (A)
- Lentz, T L et al. "Binding of rabies virus to purified Torpedo acetylcholine receptor." *Brain research* vol. 387,3 (1986): 211-9. doi:10.1016/0169-328x(86)90027-6
- Lescar, J et al. "The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH." *Cell* vol. 105,1 (2001): 137-48. doi:10.1016/s0092-8674(01)00303-8
- Letchworth, G J et al. "Vesicular stomatitis." *Veterinary journal (London, England : 1997)* vol. 157,3 (1999): 239-60. doi:10.1053/tvj.1998.0303
- Leyrat, Cédric et al. "Structure of the vesicular stomatitis virus N<sup>o</sup>-P complex." *PLoS pathogens* vol. 7,9 (2011): e1002248. doi:10.1371/journal.ppat.1002248

- Li, Jianrong et al. "A conserved motif in region v of the large polymerase proteins of nonsegmented negative-sense RNA viruses that is essential for mRNA capping." *Journal of virology* vol. 82,2 (2008): 775-84. doi:10.1128/JVI.02107-07
- Li, Jianrong et al. "Amino acid residues within conserved domain VI of the vesicular stomatitis virus large polymerase protein essential for mRNA cap methyltransferase activity." *Journal of virology* vol. 79,21 (2005): 13373-84. doi:10.1128/JVI.79.21.13373-13384.2005
- Li, Shuo. "Detergents and alternatives in cryo-EM studies of membrane proteins." *Acta biochimica et biophysica Sinica* vol. 54,8 (2022): 1049-1056. doi:10.3724/abbs.2022088
- Liang, Bo et al. "Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy." *Cell* vol. 162,2 (2015): 314-327. doi:10.1016/j.cell.2015.06.018
- Libersou, Sonia et al. "Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion." *The Journal of cell biology* vol. 191,1 (2010): 199-210. doi:10.1083/jcb.201006116
- Lin, Xingcheng et al. "Atomistic simulations indicate the functional loop-to-coiled-coil transition in influenza hemagglutinin is not downhill." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 115,34 (2018): E7905-E7913. doi:10.1073/pnas.1805442115
- Liu, Nina et al. "Conformational and lipid bilayer-perturbing properties of Marburg virus GP2 segments containing the fusion loop and membrane-proximal external region/transmembrane domain." *Heliyon* vol. 5,12 e03018. 12 Dec. 2019, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e03018
- Liu, Ye et al. "Evaluation of rabies biologics against Irkut virus isolated in China." *Journal of clinical microbiology* vol. 51,11 (2013): 3499-504. doi:10.1128/JCM.01565-13
- Liu, Yuhang et al. "Prefusion structure of human cytomegalovirus glycoprotein B and structural basis for membrane fusion." *Science advances* vol. 7,10 eabf3178. 5 Mar. 2021, doi:10.1126/sciadv.abf3178
- López-Roig, Marc et al. "Seroprevalence dynamics of European bat lyssavirus type 1 in a multispecies bat colony." *Viruses* vol. 6,9 3386-99. 4 Sep. 2014, doi:10.3390/v6093386
- Lu, Lenette L et al. "Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases." *Nature reviews. Immunology* vol. 18,1 (2018): 46-61. doi:10.1038/nri.2017.106
- Luo, L H et al. "Point mutations in glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) selected by resistance to neutralization by epitope-specific monoclonal antibodies." *Virology* vol. 163,2 (1988): 341-8. doi:10.1016/0042-6822(88)90274-7
- Lyles, D S, and M O McKenzie. "Reversible and irreversible steps in assembly and disassembly of vesicular stomatitis virus: equilibria and kinetics of dissociation of nucleocapsid-M protein complexes assembled in vivo." *Biochemistry* vol. 37,2 (1998): 439-50. doi:10.1021/bi971812j
- Mammano, F et al. "Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4+ cells." *Journal of virology* vol. 71,4 (1997): 3341-5. doi:10.1128/JVI.71.4.3341-3345.1997
- Mammano, F et al. "Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4+ cells." *Journal of virology* vol. 71,4 (1997): 3341-5. doi:10.1128/JVI.71.4.3341-3345.1997
- Mangala Prasad, Vidya et al. "Visualization of conformational changes and membrane remodeling leading to genome delivery by viral class-II fusion machinery." *Nature communications* vol. 13,1 4772. 15 Aug. 2022, doi:10.1038/s41467-022-32431-9
- Manghani, D K et al. "Pleomorphism of fine structure of rabies virus in human and experimental brain." *Journal of the neurological sciences* vol. 75,2 (1986): 181-93. doi:10.1016/0022-510x(86)90093-6
- Marasini, Bishal et al. "Mucosal AIDS virus transmission is enhanced by antiviral IgG isolated early in infection." *AIDS (London, England)* vol. 35,15 (2021): 2423-2432. doi:10.1097/QAD.0000000000003050
- Marissen, Wilfred E et al. "Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis." *Journal of virology* vol. 79,8 (2005): 4672-8. doi:10.1128/JVI.79.8.4672-4678.2005
- Markin, V S et al. "On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism." *General physiology and biophysics* vol. 3,5 (1984): 361-77.
- Markotter, Wanda et al. "Lagos bat virus, South Africa." *Emerging infectious diseases* vol. 12,3 (2006): 504-6. doi:10.3201/eid1203.051306
- Marshall, Michael J E et al. "Therapeutic Antibodies: What Have We Learnt from Targeting CD20 and Where Are We Going?." *Frontiers in immunology* vol. 8 1245. 4 Oct. 2017, doi:10.3389/fimmu.2017.01245
- Marston, Denise A et al. "Genetic analysis of a rabies virus host shift event reveals within-host viral dynamics in a new host." *Virus evolution* vol. 3,2 vex038. 13 Dec. 2017, doi:10.1093/ve/vex038

- Marston, Denise A et al. "Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet." *Emerging infectious diseases* vol. 18,4 (2012): 664-7. doi:10.3201/eid1804.111553
- Marston, Denise A et al. "The lyssavirus host-specificity conundrum-rabies virus-the exception not the rule." *Current opinion in virology* vol. 28 (2018): 68-73. doi:10.1016/j.coviro.2017.11.007
- Martinez, Isidoro, and Gail W Wertz. "Biological differences between vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotype glycoproteins: identification of amino acid residues modulating pH-dependent infectivity." *Journal of virology* vol. 79,6 (2005): 3578-85. doi:10.1128/JVI.79.6.3578-3585.2005
- Mastraccio, Kate E et al. "mAb therapy controls CNS-resident lyssavirus infection via a CD4 T cell-dependent mechanism." *EMBO molecular medicine* vol. 15,10 (2023): e16394. doi:10.15252/emmm.202216394
- Mathieu, M E et al. "Folding, unfolding, and refolding of the vesicular stomatitis virus glycoprotein." *Biochemistry* vol. 35,13 (1996): 4084-93. doi:10.1021/bi952924i
- Matsumoto, S. "Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus." *Virology* vol. 17 (1962): 198-202. doi:10.1016/0042-6822(62)90099-5
- Mazarakis, N D et al. "Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery." *Human molecular genetics* vol. 10,19 (2001): 2109-21. doi:10.1093/hmg/10.19.2109
- Meditis, Iris et al. "Extensive flavivirus E trimer breathing accompanies stem zippering of the post-fusion hairpin." *EMBO reports* vol. 21,8 (2020): e50069. doi:10.15252/embr.202050069
- Mellors, Jack, and Miles Carroll. "Direct enhancement of viral neutralising antibody potency by the complement system: a largely forgotten phenomenon." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* vol. 81,1 22. 11 Jan. 2024, doi:10.1007/s00018-023-05074-2
- Miyauchi, Kosuke et al. "The membrane-spanning domain of gp41 plays a critical role in intracellular trafficking of the HIV envelope protein." *Retrovirology* vol. 7 95. 13 Nov. 2010, doi:10.1186/1742-4690-7-95
- Moon, Seokoh et al. "Bifunctional hetero di-disc for broad-spectrum influenza neutralization." *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* vol. 44 (2022): 102587. doi:10.1016/j.nano.2022.102587
- Morin, Benjamin et al. "An In Vitro RNA Synthesis Assay for Rabies Virus Defines Ribonucleoprotein Interactions Critical for Polymerase Activity." *Journal of virology* vol. 91,1 e01508-16. 16 Dec. 2016, doi:10.1128/JVI.01508-16
- Munis, Altar M et al. "A tool with many applications: vesicular stomatitis virus in research and medicine." *Expert opinion on biological therapy* vol. 20,10 (2020): 1187-1201. doi:10.1080/14712598.2020.1787981
- Munis, Altar M et al. "Characterization of Antibody Interactions with the G Protein of Vesicular Stomatitis Virus Indiana Strain and Other Vesiculovirus G Proteins." *Journal of virology* vol. 92,23 e00900-18. 12 Nov. 2018, doi:10.1128/JVI.00900-18
- Munis, Altar M et al. "Use of Heterologous Vesiculovirus G Proteins Circumvents the Humoral Anti-envelope Immunity in Lentivector-Based In Vivo Gene Delivery." *Molecular therapy. Nucleic acids* vol. 17 (2019): 126-137. doi:10.1016/j.omtn.2019.05.010
- Muñoz-Barroso, I et al. "Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41." *The Journal of cell biology* vol. 140,2 (1998): 315-23. doi:10.1083/jcb.140.2.315
- Munyeku-Bazitama, Yannick et al. "Characterization of human tibrovirus envelope glycoproteins." *Journal of virology* vol. 98,7 (2024): e0049924. doi:10.1128/jvi.00499-24
- Murin, Charles D et al. "Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses." *Nature microbiology* vol. 4,5 (2019): 734-747. doi:10.1038/s41564-019-0392-y
- Murphy, F A, and S P Bauer. "Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system." *Intervirology* vol. 3,4 (1974): 256-68. doi:10.1159/000149762
- Murphy, F A. "Rabies pathogenesis." *Archives of virology* vol. 54,4 (1977): 279-97. doi:10.1007/BF01314774
- Nasr, Mahmoud L et al. "Covalently circularized nanodiscs for studying membrane proteins and viral entry." *Nature methods* vol. 14,1 (2017): 49-52. doi:10.1038/nmeth.4079
- Nasr, Mahmoud L et al. "Covalently circularized nanodiscs for studying membrane proteins and viral entry." *Nature methods* vol. 14,1 (2017): 49-52. doi:10.1038/nmeth.4079
- Navaratnarajah, Chanakha K et al. "Receptor-mediated cell entry of paramyxoviruses: Mechanisms, and consequences for tropism and pathogenesis." *The Journal of biological chemistry*

- vol. 295,9 (2020): 2771-2786.  
doi:10.1074/jbc.REV119.009961
- Nevers, Quentin et al. "Properties of rabies virus phosphoprotein and nucleoprotein biocondensates formed in vitro and in cellulose." *PLoS pathogens* vol. 18,12 e1011022. 8 Dec. 2022, doi:10.1371/journal.ppat.1011022
- Newton, Natalee D et al. "The structure of an infectious immature flavivirus redefines viral architecture and maturation." *Science advances* vol. 7,20 eabe4507. 14 May. 2021, doi:10.1126/sciadv.abe4507
- Ng, Weng M et al. "Structure of trimeric pre-fusion rabies virus glycoprotein in complex with two protective antibodies." *Cell host & microbe* vol. 30,9 (2022): 1219-1230.e7. doi:10.1016/j.chom.2022.07.014
- Nikolic, Jovan et al. "Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles." *Nature communications* vol. 8,1 58. 5 Jul. 2017, doi:10.1038/s41467-017-00102-9
- Nikolic, Jovan et al. "Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein." *Nature communications* vol. 9,1 1029. 12 Mar. 2018, doi:10.1038/s41467-018-03432-4
- Nokireki, T et al. "Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland." *Transboundary and emerging diseases* vol. 65,3 (2018): 593-596. doi:10.1111/tbed.12833
- Obiang, Linda et al. "Phenotypes of vesicular stomatitis virus mutants with mutations in the PSAP motif of the matrix protein." *The Journal of general virology* vol. 93,Pt 4 (2012): 857-865. doi:10.1099/vir.0.039800-0
- Odell, D et al. "Influence of membrane anchoring and cytoplasmic domains on the fusogenic activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein G." *Journal of virology* vol. 71,10 (1997): 7996-8000. doi:10.1128/JVI.71.10.7996-8000.1997
- Ogino, Tomoaki, and Amiya K Banerjee. "Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus." *Molecular cell* vol. 25,1 (2007): 85-97. doi:10.1016/j.molcel.2006.11.013
- Olivier, M, et al. "Evidence of a novel viral membrane fusion mechanism shared by the Hepaci, Pegi and Pestiviruses." *bioRxiv* 2022.10.18.512720; doi: https://doi.org/10.1101/2022.10.18.512720
- Pabis, Anna et al. "Influenza hemagglutinin drives viral entry via two sequential intramembrane mechanisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 117,13 (2020): 7200-7207. doi:10.1073/pnas.1914188117
- Parren, P W, and D R Burton. "The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo." *Advances in immunology* vol. 77 (2001): 195-262. doi:10.1016/s0065-2776(01)77018-6
- Parsegian, V A et al. "Measured work of deformation and repulsion of lecithin bilayers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 76,6 (1979): 2750-4. doi:10.1073/pnas.76.6.2750
- Parsons, Matthew S et al. "Fc-dependent functions are redundant to efficacy of anti-HIV antibody PGT121 in macaques." *The Journal of clinical investigation* vol. 129,1 (2019): 182-191. doi:10.1172/JCI122466
- Pasdeloup, David et al. "Nucleocytoplasmic shuttling of the rabies virus P protein requires a nuclear localization signal and a CRM1-dependent nuclear export signal." *Virology* vol. 334,2 (2005): 284-93. doi:10.1016/j.virol.2005.02.005
- Pauszek, Steven J et al. "Characterization of the full-length genomic sequences of vesicular stomatitis Cocal and Alagoas viruses." *Archives of virology* vol. 153,7 (2008): 1353-7. doi:10.1007/s00705-008-0113-y
- Peng, Ruchao et al. "Structures of human-infecting Thogotovirus fusogens support a common ancestor with insect baculovirus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 114,42 (2017): E8905-E8912. doi:10.1073/pnas.1706125114
- Pennington, Hallie N, and Jinwoo Lee. "Lassa virus glycoprotein complex review: insights into its unique fusion machinery." *Bioscience reports* vol. 42,2 (2022): BSR20211930. doi:10.1042/BSR20211930
- Petersen, Rejane L. "Strategies Using Bio-Layer Interferometry Biosensor Technology for Vaccine Research and Development." *Biosensors* vol. 7,4 49. 31 Oct. 2017, doi:10.3390/bios7040049
- Piccinotti, Silvia et al. "Uptake of rabies virus into epithelial cells by clathrin-mediated endocytosis depends upon actin." *Journal of virology* vol. 87,21 (2013): 11637-47. doi:10.1128/JVI.01648-13
- Piccinotti, Silvia, and Sean P J Whelan. "Rabies Internalizes into Primary Peripheral Neurons via Clathrin Coated Pits and Requires Fusion at the Cell Body." *PLoS pathogens* vol. 12,7 e1005753. 27 Jul. 2016, doi:10.1371/journal.ppat.1005753
- Piccoli, Luca et al. "Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology." *Cell* vol. 183,4 (2020): 1024-1042.e21. doi:10.1016/j.cell.2020.09.037
- Poch, O et al. "Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-

- strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains." *The Journal of general virology* vol. 71 ( Pt 5) (1990): 1153-62. doi:10.1099/0022-1317-71-5-1153
- Power, Anthony T et al. "Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity." *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 15,1 (2007): 123-30. doi:10.1038/sj.mt.6300039
- Prehaud, C et al. "Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence." *Journal of virology* vol. 62,1 (1988): 1-7. doi:10.1128/JVI.62.1.1-7.1988
- Pulkkinen, Lauri I A et al. "Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View." *Viruses* vol. 10,7 350. 28 Jun. 2018, doi:10.3390/v10070350
- Punjani, Ali et al. "cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination." *Nature methods* vol. 14,3 (2017): 290-296. doi:10.1038/nmeth.4169
- Punjani, Ali et al. "cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination." *Nature methods* vol. 14,3 (2017): 290-296. doi:10.1038/nmeth.4169
- Punjani, Ali, and David J Fleet. "3D variability analysis: Resolving continuous flexibility and discrete heterogeneity from single particle cryo-EM." *Journal of structural biology* vol. 213,2 (2021): 107702. doi:10.1016/j.jsb.2021.107702
- Punjani, Ali, and David J Fleet. "3DFlex: determining structure and motion of flexible proteins from cryo-EM." *Nature methods* vol. 20,6 (2023): 860-870. doi:10.1038/s41592-023-01853-8
- Rabishield. Serum Institute of India PVT. LTD.; 2021 Available at: [https://www.seruminstitute.com/product\\_ind\\_rabishi\\_eld.php](https://www.seruminstitute.com/product_ind_rabishi_eld.php).
- Rahmeh, Amal A et al. "Molecular architecture of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 107,46 (2010): 20075-80. doi:10.1073/pnas.1013559107
- Ranaweera, Ahinsa et al. "Hydrogen-Deuterium Exchange Supports Independent Membrane-Interfacial Fusion Peptide and Transmembrane Domains in Subunit 2 of Influenza Virus Hemagglutinin Protein, a Structured and Aqueous-Protected Connection between the Fusion Peptide and Soluble Ectodomain, and the Importance of Membrane Apposition by the Trimer-of-Hairpins Structure." *Biochemistry* vol. 58,19 (2019): 2432-2446. doi:10.1021/acs.biochem.8b01272
- Rand, R P, and V A Parsegian. "Physical force considerations in model and biological membranes." *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire* vol. 62,8 (1984): 752-9. doi:10.1139/o84-097
- Raux, H et al. "Monoclonal antibodies which recognize the acidic configuration of the rabies glycoprotein at the surface of the virion can be neutralizing." *Virology* vol. 210,2 (1995): 400-8. doi:10.1006/viro.1995.1356
- Raux, Hélène et al. "The matrix protein of vesicular stomatitis virus binds dynamin for efficient viral assembly." *Journal of virology* vol. 84,24 (2010): 12609-18. doi:10.1128/JVI.01400-10
- Rayaprolu V, Fulton BO, Rafique A, et al. Structure of the Inmazed cocktail and resistance to Ebola virus escape. *Cell Host Microbe*. 2023;31(2):260-272.e7. doi:10.1016/j.chom.2023.01.002
- Reardon, Patrick N et al. "Structure of an HIV-1-neutralizing antibody target, the lipid-bound gp41 envelope membrane proximal region trimer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,4 (2014): 1391-6. doi:10.1073/pnas.1309842111
- Redondo, Natalia et al. "Impact of Vesicular Stomatitis Virus M Proteins on Different Cellular Functions." *PLoS one* vol. 10,6 e0131137. 19 Jun. 2015, doi:10.1371/journal.pone.0131137
- Regnault, Béatrice et al. "First Case of Lethal Encephalitis in Western Europe Due to European Bat Lyssavirus Type 1." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 74,3 (2022): 461-466. doi:10.1093/cid/ciab443
- Rey, F A et al. "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution." *Nature* vol. 375,6529 (1995): 291-8. doi:10.1038/375291a0
- Richardson, Simone I et al. "IgG3 enhances neutralization potency and Fc effector function of an HIV V2-specific broadly neutralizing antibody." *PLoS pathogens* vol. 15,12 e1008064. 16 Dec. 2019, doi:10.1371/journal.ppat.1008064
- Riedel, Christiane et al. "Cryo EM structure of the rabies virus ribonucleoprotein complex." *Scientific reports* vol. 9,1 9639. 3 Jul. 2019, doi:10.1038/s41598-019-46126-7
- Riedel, Christiane et al. "Native structure of a retroviral envelope protein and its conformational change upon interaction with the target cell." *Journal of structural biology* vol. 197,2 (2017): 172-180. doi:10.1016/j.jsb.2016.06.017
- Roche, S et al. "Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* vol. 65,11 (2008): 1716-28. doi:10.1007/s00018-008-7534-3



- Roche, Stéphane et al. "Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G." *Science (New York, N. Y.)* vol. 313,5784 (2006): 187-91. doi:10.1126/science.1127683
- Roche, Stéphane et al. "Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G." *Science (New York, N. Y.)* vol. 315,5813 (2007): 843-8. doi:10.1126/science.1135710
- Roche, Stéphane, and Yves Gaudin. "Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers." *Virology* vol. 297,1 (2002): 128-35. doi:10.1006/viro.2002.1429
- Rodriguez, L. L. & Pauszek, S. J. (2012). Genus *Vesiculovirus*. In *Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Host-Vector Interactions, Cytopathology and Control*, pp. 23-35. Edited by R. G. Dietzgen & I. V. Kuzmin. Norfolk, U.K.: Caister Academic Press.
- Rubinstein, Menachem. "Is Lgr4 essential for VSV- and VSV-G-pseudotyped lentiviral vector entry to cells?" *The Journal of biological chemistry* vol. 293,1 (2018): 112. doi:10.1074/jbc.L117.000471
- Rupprecht, Charles E et al. "A perspective on lyssavirus emergence and perpetuation." *Current opinion in virology* vol. 1,6 (2011): 662-70. doi:10.1016/j.coviro.2011.10.014
- Sadelain, Michel et al. "Therapeutic T cell engineering." *Nature* vol. 545,7655 (2017): 423-431. doi:10.1038/nature22395
- Scheepers, Cathrine et al. "Antibody Isotype Switching as a Mechanism to Counter HIV Neutralization Escape." *Cell reports* vol. 33,8 (2020): 108430. doi:10.1016/j.celrep.2020.108430
- Scher, Gabrielle, and Matthias J Schnell. "Rhabdoviruses as vectors for vaccines and therapeutics." *Current opinion in virology* vol. 44 (2020): 169-182. doi:10.1016/j.coviro.2020.09.003
- Schnell, M J et al. "Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 93,21 (1996): 11359-65. doi:10.1073/pnas.93.21.11359
- Schoehn, G et al. "Structure of recombinant rabies virus nucleoprotein-RNA complex and identification of the phosphoprotein binding site." *Journal of virology* vol. 75,1 (2001): 490-8. doi:10.1128/JVI.75.1.490-498.2001
- Scrima, Nathalie et al. "Rabies virus P protein binds to TBK1 and interferes with the formation of innate immunity-related liquid condensates." *Cell reports* vol. 42,1 (2023): 111949. doi:10.1016/j.celrep.2022.111949
- Seif, I et al. "Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein." *Journal of virology* vol. 53,3 (1985): 926-34. doi:10.1128/JVI.53.3.926-934.1985
- Sejvar, James J. "The evolving epidemiology of viral encephalitis." *Current opinion in neurology* vol. 19,4 (2006): 350-7. doi:10.1097/01.wco.0000236613.74462.4c
- Sengar, Anjali et al. "Mechanistic dissection of antibody inhibition of influenza entry yields unexpected heterogeneity." *Biophysical journal* vol. 122,11 (2023): 1996-2006. doi:10.1016/j.bpj.2022.10.026
- Serrão, Vitor Hugo B et al. "Snapshot of an influenza virus glycoprotein fusion intermediate." *Cell reports* vol. 35,7 (2021): 109152. doi:10.1016/j.celrep.2021.109152
- Shepherd, James G et al. "Emerging Rhabdoviruses and Human Infection." *Biology* vol. 12,6 878. 17 Jun. 2023, doi:10.3390/biology12060878
- Shepherd, James G et al. "Emerging Rhabdoviruses and Human Infection." *Biology* vol. 12,6 878. 17 Jun. 2023, doi:10.3390/biology12060878
- Shi, Chenjuan et al. "Research progress on neutralizing epitopes and antibodies for the Rabies virus." *Infectious medicine* vol. 1,4 262-271. 24 Sep. 2022, doi:10.1016/j.imj.2022.09.003
- Si, Zhu et al. "Locations and in situ structure of the polymerase complex inside the virion of vesicular stomatitis virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 119,18 (2022): e2111948119. doi:10.1073/pnas.2111948119
- Sleat, D E, and A K Banerjee. "Transcriptional activity and mutational analysis of recombinant vesicular stomatitis virus RNA polymerase." *Journal of virology* vol. 67,3 (1993): 1334-9. doi:10.1128/JVI.67.3.1334-1339.1993
- Smart, Oliver S et al. "Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER." *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* vol. 68,Pt 4 (2012): 368-80. doi:10.1107/S0907444911056058
- Solon, Jérôme et al. "Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system." *The Journal of general virology* vol. 86,Pt 12 (2005): 3357-3363. doi:10.1099/vir.0.81129-0
- Sparrow, Erin et al. "Recent advances in the development of monoclonal antibodies for rabies

- post exposure prophylaxis: A review of the current status of the clinical development pipeline." *Vaccine* vol. 37 Suppl 1 (2019): A132-A139. doi:10.1016/j.vaccine.2018.11.004
- Srivastava, Jyoti et al. "Intracellular pH sensors: design principles and functional significance." *Physiology (Bethesda, Md.)* vol. 22 (2007): 30-9. doi:10.1152/physiol.00035.2006
- Stanifer, Megan L et al. "A recombinant vesicular stomatitis virus bearing a lethal mutation in the glycoprotein gene uncovers a second site suppressor that restores fusion." *Journal of virology* vol. 85,16 (2011): 8105-15. doi:10.1128/JVI.00735-11
- Steffen, Imke et al. "Characterization of the Bas-Congo virus glycoprotein and its function in pseudotyped viruses." *Journal of virology* vol. 87,17 (2013): 9558-68. doi:10.1128/JVI.01183-13
- Stein, Alexander et al. "Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane." *Nature* vol. 460,7254 (2009): 525-8. doi:10.1038/nature08156
- Stiasny, Karin et al. "Characterization of a membrane-associated trimeric low-pH-induced Form of the class II viral fusion protein E from tick-borne encephalitis virus and its crystallization." *Journal of virology* vol. 78,6 (2004): 3178-83. doi:10.1128/jvi.78.6.3178-3183.2004
- Stieneke-Gröber, A et al. "Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease." *The EMBO journal* vol. 11,7 (1992): 2407-14. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05305.x
- Stingaciu, Laura R et al. "Fast antibody fragment motion: flexible linkers act as entropic spring." *Scientific reports* vol. 6 22148. 29 Mar. 2016, doi:10.1038/srep22148
- Stojdl, D F et al. "Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus." *Nature medicine* vol. 6,7 (2000): 821-5. doi:10.1038/77558
- Strack, B et al. "A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 97,24 (2000): 13063-8. doi:10.1073/pnas.97.24.13063
- Stubbs, Sarah Hulseley et al. "Vesicular Stomatitis Virus Chimeras Expressing the Oropouche Virus Glycoproteins Elicit Protective Immune Responses in Mice." *mBio* vol. 12,4 (2021): e0046321. doi:10.1128/mBio.00463-21
- Sun, Xiangjie et al. "Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein." *The Journal of biological chemistry* vol. 283,10 (2008): 6418-27. doi:10.1074/jbc.M708955200
- Supekar, Vinit M et al. "Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 101,52 (2004): 17958-63. doi:10.1073/pnas.0406128102
- Swintek, B Dancho, and Douglas S Lyles. "Plasma membrane microdomains containing vesicular stomatitis virus M protein are separate from microdomains containing G protein and nucleocapsids." *Journal of virology* vol. 82,11 (2008): 5536-47. doi:10.1128/JVI.02407-07
- Tay, Matthew Zirui et al. "Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses." *Frontiers in immunology* vol. 10 332. 28 Feb. 2019, doi:10.3389/fimmu.2019.00332
- Terwilliger, Thomas C et al. "Accelerating crystal structure determination with iterative AlphaFold prediction." *Acta crystallographica. Section D, Structural biology* vol. 79,Pt 3 (2023): 234-244. doi:10.1107/S205979832300102X
- Tesfay, Mulu Z et al. "Vesiculovirus neutralization by natural IgM and complement." *Journal of virology* vol. 88,11 (2014): 6148-57. doi:10.1128/JVI.00074-14
- Tesh, R et al. "Isfahan virus, a new vesiculovirus infecting humans, gerbils, and sandflies in Iran." *The American journal of tropical medicine and hygiene* vol. 26,2 (1977): 299-306. doi:10.4269/ajtmh.1977.26.299
- Thébault, Stéphanie et al. "Biosynthetic proteins targeting the SARS-CoV-2 spike as anti-virals." *PLoS pathogens* vol. 18,9 e1010799. 6 Sep. 2022, doi:10.1371/journal.ppat.1010799
- Thomas, D et al. "Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis." *Journal of virology* vol. 54,2 (1985): 598-607. doi:10.1128/JVI.54.2.598-607.1985
- Thoulouze, M I et al. "The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus." *Journal of virology* vol. 72,9 (1998): 7181-90. doi:10.1128/JVI.72.9.7181-7190.1998
- Timmins, Joanna et al. "Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4." *Journal of molecular biology* vol. 326,2 (2003): 493-502. doi:10.1016/s0022-2836(02)01406-7
- Tiouajni, Mounira et al. "Structural and functional analysis of the fibronectin-binding protein FNE from *Streptococcus equi* spp. *equi*." *The FEBS journal* vol. 281,24 (2014): 5513-31. doi:10.1111/febs.13092

- Tiouajni, Mounira et al. "Structural and functional analysis of the fibronectin-binding protein FNE from *Streptococcus equi* spp. *equi*." *The FEBS journal* vol. 281,24 (2014): 5513-31. doi:10.1111/febs.13092
- Tordo, N et al. "Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses." *Virology* vol. 165,2 (1988): 565-76. doi:10.1016/0042-6822(88)90600-9
- Torrents de la Peña, Alba et al. "Structure of the hepatitis C virus E1E2 glycoprotein complex." *Science (New York, N.Y.)* vol. 378,6617 (2022): 263-269. doi:10.1126/science.abn9884
- Tudor, Daniela et al. "Isotype modulates epitope specificity, affinity, and antiviral activities of anti-HIV-1 human broadly neutralizing 2F5 antibody." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 109,31 (2012): 12680-5. doi:10.1073/pnas.1200024109
- Tuffereau, C et al. "Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice." *Virology* vol. 172,1 (1989): 206-12. doi:10.1016/0042-6822(89)90122-0
- Tuffereau, C et al. "Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus." *The EMBO journal* vol. 17,24 (1998): 7250-9. doi:10.1093/emboj/17.24.7250
- Udow, Sean J et al. "Clinical features of dog- and bat-acquired rabies in humans." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 57,5 (2013): 689-96. doi:10.1093/cid/cit372
- Urvoas, Agathe et al. "Artificial proteins from combinatorial approaches." *Trends in biotechnology* vol. 30,10 (2012): 512-20. doi:10.1016/j.tibtech.2012.06.001
- Urvoas, Agathe et al. "Design, production and molecular structure of a new family of artificial alpha-helical repeat proteins ( $\alpha$ Rep) based on thermostable HEAT-like repeats." *Journal of molecular biology* vol. 404,2 (2010): 307-27. doi:10.1016/j.jmb.2010.09.048
- Vagin A., Teplyakov A.. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* 1997; 30:1022–1025.
- Valerio-Lepiniec, Marie et al. "The  $\alpha$ Rep artificial repeat protein scaffold: a new tool for crystallization and live cell applications." *Biochemical Society transactions* vol. 43,5 (2015): 819-24. doi:10.1042/BST20150075
- Vallbracht, Melina et al. "Structure-Function Dissection of Pseudorabies Virus Glycoprotein B Fusion Loops." *Journal of virology* vol. 92,1 e01203-17. 14 Dec. 2017, doi:10.1128/JVI.01203-17
- van der Heijden, R W et al. "Structural and functional studies on a unique linear neutralizing antigenic site (G5) of the rabies virus glycoprotein." *The Journal of general virology* vol. 74 ( Pt 8) (1993): 1539-45. doi:10.1099/0022-1317-74-8-1539
- Vandepol, S B et al. "Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus." *Virology* vol. 148,2 (1986): 312-25. doi:10.1016/0042-6822(86)90328-4
- Vaney, Marie-Christine et al. "Evolution and activation mechanism of the flavivirus class II membrane-fusion machinery." *Nature communications* vol. 13,1 3718. 28 Jun. 2022, doi:10.1038/s41467-022-31111-y
- Victor, Bruno L et al. "Self-assembly molecular dynamics simulations shed light into the interaction of the influenza fusion Peptide with a membrane bilayer." *Journal of chemical information and modeling* vol. 55,4 (2015): 795-805. doi:10.1021/ci500756v
- Victor, Bruno L et al. "Structural determinants for the membrane insertion of the transmembrane peptide of hemagglutinin from influenza virus." *Journal of chemical information and modeling* vol. 52,11 (2012): 3001-12. doi:10.1021/ci3003396
- Vollmer, B et al. "The prefusion structure of herpes simplex virus glycoprotein B." *Science advances* vol. 6,39 eabc1726. 25 Sep. 2020, doi:10.1126/sciadv.abc1726
- Walker, Peter J et al. "Evolution of genome size and complexity in the rhabdoviridae." *PLoS pathogens* vol. 11,2 e1004664. 13 Feb. 2015, doi:10.1371/journal.ppat.1004664
- Walls, Alexandra C et al. "Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein." *Cell* vol. 181,2 (2020): 281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
- Wang, Jinliang et al. "Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus." *PLoS pathogens* vol. 14,7 e1007189. 20 Jul. 2018, doi:10.1371/journal.ppat.1007189
- Webb, Stacy et al. "Hendra virus fusion protein transmembrane domain contributes to pre-fusion protein stability." *The Journal of biological chemistry* vol. 292,14 (2017): 5685-5694. doi:10.1074/jbc.M117.777235
- Weis, W et al. "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid." *Nature* vol. 333,6172 (1988): 426-31. doi:10.1038/333426a0

- Weissenhorn, W et al. "Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41." *Nature* vol. 387,6631 (1997): 426-30. doi:10.1038/387426a0
- Weissenhorn, W et al. "Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain." *Molecular cell* vol. 2,5 (1998): 605-16. doi:10.1016/s1097-2765(00)80159-8
- Wentink, Koen et al. "Putting on molecular weight: Enabling cryo-EM structure determination of sub-100-kDa proteins." *Current research in structural biology* vol. 4 332-337. 2 Oct. 2022, doi:10.1016/j.crstbi.2022.09.005
- Weyer, J et al. "Cross-protective and cross-reactive immune responses to recombinant vaccinia viruses expressing full-length lyssavirus glycoprotein genes." *Epidemiology and infection* vol. 136,5 (2008): 670-8. doi:10.1017/S0950268807008965
- White, Judith M et al. "Viral Membrane Fusion: A Dance Between Proteins and Lipids." *Annual review of virology* vol. 10,1 (2023): 139-161. doi:10.1146/annurev-virology-111821-093413
- White, Judith M, and Gary R Whittaker. "Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* vol. 17,6 (2016): 593-614. doi:10.1111/tra.12389
- Whitlow, Zackary W et al. "Preferential translation of vesicular stomatitis virus mRNAs is conferred by transcription from the viral genome." *Journal of virology* vol. 80,23 (2006): 11733-42. doi:10.1128/JVI.00971-06
- Whitt, M A, and J K Rose. "Fatty acid acylation is not required for membrane fusion activity or glycoprotein assembly into VSV virions." *Virology* vol. 185,2 (1991): 875-8. doi:10.1016/0042-6822(91)90563-q
- WHO 2018a : Meslin, Francois-X., et al. *Laboratory techniques in rabies*. World Health Organization, 1996 (A)
- WHO 2018b : Who. "Rabies vaccines: WHO position paper, April 2018—Recommendations." *Vaccine* 36.37 (2018): 5500-5503. (B)
- WHO 2019 : <https://www.who.int/fr/news/item/12-11-2019-who-prequalifies-ebola-vaccine-paving-the-way-for-its-use-in-high-risk-countries>
- Wilson, I A et al. "Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution." *Nature* vol. 289,5796 (1981): 366-73. doi:10.1038/289366a0
- Wimley, W C, and S H White. "Partitioning of tryptophan side-chain analogs between water and cyclohexane." *Biochemistry* vol. 31,51 (1992): 12813-8. doi:10.1021/bi00166a015
- Wrapp, Daniel et al. "Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation." *Science (New York, N.Y.)* vol. 367,6483 (2020): 1260-1263. doi:10.1126/science.abb2507
- Wu, Weining et al. "Mapping the pH Sensors Critical for Host Cell Entry by a Complex Nonenveloped Virus." *Journal of virology* vol. 93,4 e01897-18. 5 Feb. 2019, doi:10.1128/JVI.01897-18
- Xiao, Peng et al. "Replicating adenovirus-simian immunodeficiency virus (SIV) recombinant priming and envelope protein boosting elicits localized, mucosal IgA immunity in rhesus macaques correlated with delayed acquisition following a repeated low-dose rectal SIV(mac251) challenge." *Journal of virology* vol. 86,8 (2012): 4644-57. doi:10.1128/JVI.06812-11
- Xing, Yi et al. "A site of varicella-zoster virus vulnerability identified by structural studies of neutralizing antibodies bound to the glycoprotein complex gHgL." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 112,19 (2015): 6056-61. doi:10.1073/pnas.1501176112
- Xu, Rui, and Ian A Wilson. "Structural characterization of an early fusion intermediate of influenza virus hemagglutinin." *Journal of virology* vol. 85,10 (2011): 5172-82. doi:10.1128/JVI.02430-10
- Xu, Yanhui et al. "Structural basis for coronavirus-mediated membrane fusion. Crystal structure of mouse hepatitis virus spike protein fusion core." *The Journal of biological chemistry* vol. 279,29 (2004): 30514-22. doi:10.1074/jbc.M403760200
- Yamada, S, and S Ohnishi. "Vesicular stomatitis virus binds and fuses with phospholipid domain in target cell membranes." *Biochemistry* vol. 25,12 (1986): 3703-8. doi:10.1021/bi00360a034
- Yang, Fanli et al. "Structural Analysis of Rabies Virus Glycoprotein Reveals pH-Dependent Conformational Changes and Interactions with a Neutralizing Antibody." *Cell host & microbe* vol. 27,3 (2020): 441-453.e7. doi:10.1016/j.chom.2019.12.012
- Yao, Hongwei et al. "Viral fusion protein transmembrane domain adopts  $\beta$ -strand structure to facilitate membrane topological changes for virus-cell fusion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 112,35 (2015): 10926-31. doi:10.1073/pnas.1501430112
- Yin, Hsien-Sheng et al. "Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation." *Nature* vol. 439,7072 (2006): 38-44. doi:10.1038/nature04322
- Yin, Hsien-Sheng et al. "Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein." *Proceedings of the National Academy of*

*Sciences of the United States of America* vol. 102,26 (2005): 9288-93. doi:10.1073/pnas.0503989102

York, Joanne et al. "The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex." *Journal of virology* vol. 78,19 (2004): 10783-92. doi:10.1128/JVI.78.19.10783-10792.2004

York, Joanne, and Jack H Nunberg. "Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion." *Journal of virology* vol. 80,15 (2006): 7775-80. doi:10.1128/JVI.00642-06

Young, Gavin et al. "Quantitative mass imaging of single biological macromolecules." *Science (New York, N.Y.)* vol. 360,6387 (2018): 423-427. doi:10.1126/science.aar5839

Yu, Jingyou et al. "Deletion of the SARS-CoV-2 Spike Cytoplasmic Tail Increases Infectivity in Pseudovirus Neutralization Assays." *Journal of virology* vol. 95,11 (2021): e00044-21. doi:10.1128/JVI.00044-21

Zaitseva, Elena et al. "Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins." *The Journal of cell biology* vol. 169,1 (2005): 167-77. doi:10.1083/jcb.200412059

Zeng, Wanxia et al. "Engineered extracellular vesicles for delivering functional Cas9/gRNA to eliminate hepatitis B virus cccDNA and integration." *Emerging microbes & infections* vol. 13,1 (2024): 2284286. doi:10.1080/22221751.2023.2284286

Zhang, L, and H P Ghosh. "Characterization of the putative fusogenic domain in vesicular stomatitis virus glycoprotein G." *Journal of virology* vol. 68,4 (1994): 2186-93. doi:10.1128/JVI.68.4.2186-2193.1994

Zhang, Na et al. "Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 facilitates vesicular stomatitis virus infection by binding vesicular stomatitis virus glycoprotein." *The Journal of biological chemistry* vol. 292,40 (2017): 16527-16538. doi:10.1074/jbc.M117.802090

Zhang, Rui et al. "4.4 Å cryo-EM structure of an enveloped alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus." *The EMBO journal* vol. 30,18 3854-63. 9 Aug. 2011, doi:10.1038/emboj.2011.261

Zhang, Xiaokang et al. "Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution." *Nature structural & molecular biology* vol. 20,1 (2013): 105-10. doi:10.1038/nsmb.2463

Zhou, Kang et al. "Atomic model of vesicular stomatitis virus and mechanism of assembly." *Nature communications* vol. 13,1 5980. 10 Oct. 2022, doi:10.1038/s41467-022-33664-4

Zhou, Qun Fei et al. "Structural basis of Chikungunya virus inhibition by monoclonal antibodies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 117,44 (2020): 27637-27645. doi:10.1073/pnas.2008051117 (B)

Zhou, Yu et al. "Exploring the early stages of the pH-induced conformational change of influenza hemagglutinin." *Proteins* vol. 82,10 (2014): 2412-28. doi:10.1002/prot.24606





# Étude fonctionnelle et structurale de la glycoprotéine du virus de la Stomatite Vésiculaire et des Lyssavirus

## Résumé

Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est un virus enveloppé appartenant au genre Vésiculovirus et à la famille des *Rhabdoviridae*. Son unique glycoprotéine G reconnaît un récepteur à la surface de la cellule hôte puis, après endocytose du virion, déclenche la fusion membranaire grâce à une transition structurale induite à faible pH depuis la forme pré-fusion de G vers sa forme post-fusion. Par ailleurs, G est la cible des anticorps neutralisant le virus.

Les structures cristallographiques des formes pré- et post-fusion de l'ectodomaine soluble de G (i.e. sans sa partie transmembranaire) ont été déterminées par radiocristallographie. Ces structures ont installé G comme étant le prototype des glycoprotéines de fusion de classe III. L'organisation de l'extrémité carboxyterminale de l'ectodomaine et du domaine transmembranaire de G, qui jouent un rôle important durant le processus de fusion, n'est cependant pas connue. Nous avons donc réalisé une étude par cryo-microscopie électronique sur la glycoprotéine complète, purifiée à partir de particules virales, seule ou en complexe avec un anticorps monoclonal. Cette étude nous a permis de compléter les structures de l'ectodomaine dans ses conformations pré et post-fusion. Elle révèle aussi que les domaines transmembranaires sont mobiles au sein de la membrane.

Par ailleurs, nous avons résolu deux structures de G en complexe avec un FAb dérivé d'un anticorps neutralisant, reconnaissant à la fois les formes pré- et post-fusion de plusieurs souches de Vésiculovirus. Cette première structure d'un complexe entre G et un anticorps nous a permis de caractériser finement l'épitope, d'identifier les résidus de G clefs dans l'interaction et de proposer un mécanisme de neutralisation.

Ce travail augmente de façon significative nos connaissances sur la structure de G qui est la glycoprotéine la plus utilisée en biotechnologie pour délivrer un cargo et en thérapie génique (par pseudotypage de lentivirus).

Nous avons également débuté une étude visant à caractériser les glycoprotéines des Lyssavirus, genre appartenant également à la famille des *Rhabdoviridae*, et dont le virus de la rage est le prototype. Nous avons produit et purifié les ectodomains de plusieurs Lyssavirus, et nous avons pu obtenir une structure cristallographique de l'ectodomaine du virus Ikoma qui correspondrait à un intermédiaire monomérique tardif. Afin de poursuivre le travail de caractérisation de cette structure, plusieurs approches sont en cours.

Nous avons notamment réalisé une sélection par phage display de ligands  $\alpha$ Reps dirigés contre Ikoma G en collaboration avec l'équipe de Philippe Minard et Agathe Urvoas à l'IBBC. Les  $\alpha$ Reps sont des protéines artificielles constituées par des répétitions hélicoïdales. Les  $\alpha$ Reps sélectionnées contre Ikoma G sont en cours de caractérisation. Ces outils peuvent nous servir d'aide à la cristallographie en piégeant des conformations différentes de G que celle obtenues. Elles nous serviront également d'outils pour les aspects de biologie cellulaire.

**Mots clés :** Glycoprotéines virales, Entrée virale, Fusion membranaire, Virologie structurale, Rhabdovirus.