



HAL
open science

Identification de facteurs modulant le repliement de la glycoprotéine du virus rabique

Antoine P. Maillard

► **To cite this version:**

Antoine P. Maillard. Identification de facteurs modulant le repliement de la glycoprotéine du virus rabique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), 2001. Français. NNT : . tel-02409106

HAL Id: tel-02409106

<https://hal.science/tel-02409106>

Submitted on 13 Dec 2019

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.

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
- PARIS 6 -

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'UNIVERSITE PARIS 6

spécialité

BIOCHIMIE

par

Antoine MAILLARD

Titre

**Identification de facteurs modulant le
repliement de la glycoprotéine du virus rabique**

soutenue le

17 décembre 2001

devant le jury composé de

M. Michel MORANGE.....Président
M. Marc LE MAIRE.....Rapporteur
M. Jean DUBUISSON.....Rapporteur
M. Yves GAUDIN.....Directeur de thèse

Je suis profondément reconnaissant à M. Michel Morange pour son enseignement et sa bienveillance. Je le remercie aussi d'avoir accepté la présidence du jury de cette thèse, ce qui est pour moi à la fois une grande joie et un grand honneur.

MM. Marc Le Maire et Jean Dubuisson m'ont fait l'honneur d'accepter la tâche de rapporteur. Je n'ignore pas quel effort cela représente et leur témoigne ici, brièvement mais avec chaleur, ma gratitude pour le travail accompli et leurs conseils.

Je remercie vivement M. Yves Gaudin pour le travail que nous avons fait ensemble. A l'issue de notre collaboration, je souhaite aussi le remercier pour la formation qu'il m'a donnée. La pertinence de son esprit critique et la rigueur de son travail scientifique ont en effet contribué à me faire progresser. Enfin, je suis reconnaissant à Yves de m'avoir permis de participer à la session 98 des *Doctoriales* et au congrès *FEBS 99*.

Je souhaite réunir dans ces remerciements Mme Anne Flamand et M. Félix Rey qui, un jour, à la faveur d'une pause-café, m'ont décrit la source de leur intérêt pour la virologie. Qu'ils soient tous deux remerciés pour leur travail à la tête du *Laboratoire de Génétique des Virus* et trouvent ici l'expression de la grande estime que je leur porte.

Le travail présenté ici a bénéficié de l'expertise de MM. Bruno Robert, Alain Chaffotte, Gérard Batelier, Michaël Domanski et Eric Guittet qui ont apporté leur maîtrise des techniques de biophysique et de spectroscopie utilisées dans le chapitre 2. J'ai le souvenir de rencontres productives (en données corrigées des tâtonnements expérimentaux), à la fois plaisantes et rigoureuses. Qu'ils soient remerciés pour leur disponibilité et leur accueil.

Je remercie chaleureusement Ghada Ajlani pour l'amitié qu'elle m'a témoignée dès le début de mon Service National au *CEA* de Saclay, et Bruno Robert pour sa grande bienveillance. Je remercie de la même façon Marc Lutz pour sa compréhension. Les 10 mois que j'ai passés auprès d'eux m'ont permis de reconnaître leurs qualités scientifiques et humaines.

Je remercie cordialement Hélène Raux (*Raux Consulting*), Danielle Blondel et Karine Kaelin pour leurs conseils en biologie moléculaire, Florence Lafay pour le récit de ses manips à *Orsay Corral* et son sens du détail qui fait mouche, Jacqueline Bénéjean pour son attention et ses conseils, et Christine Tuffereau pour sa disponibilité.

Je remercie de même Christine Maheu pour ses cellules, ses milieux, ses boîtes, sa verrerie, sa bonne humeur et Jacques Rolland pour sa faconde ensoleillée et son coup de main dans les tracas administratifs.

Il n'y a pas forcément une figure du manuscrit pour témoigner de leur contribution alors je suis d'autant plus attaché à remercier tous mes collègues des laboratoires de *Génétique des Virus*, d'*Enzymologie Structurale* et de *Chimie des Substances Naturelles* du CNRS de Gif-sur-Yvette, pour la sympathie et l'aide, voire le soutien qu'ils m'ont donnés quand j'en avais besoin.

Je remercie en particulier mes compagnons de l'étage rage : Christelle Langevin, Mohammed Mousli, Nicolas Poisson et Stéphane Roche, ainsi que Raoul Bercoff, Stéphane Bressanelli, Fasseli Coulibaly, Stéphane Duquerroy, Benoît Gigant, Marc Labetoulle, Jorge Navaza et Gaëlle Squires.

Je remercie aussi François Penin et Anne Op De Beeck, de passage à Paris au moment des *Journées Francophones de Virologie 2000*, pour des suggestions dont mon travail s'est fait l'écho. Merci enfin à Mmes Sybille Dezélee (gC) et Christine Tuffereau (p75), MM. Jean Dubuisson (GPI) et Winfried Weissenhorn (iiGCN4) pour des dons de matériel.

last but not least...

Bravo à l'équipe de la MIP-P6 pour son travail.

Il m'est très agréable de rappeler comment, à l'occasion de mon Service National, j'ai eu le plaisir de rencontrer des hommes et des femmes généreux que j'assure ici encore de mon amitié : Ghada, Bruno, Françoise, Alain, Diana, Anabella, Elise, Laurent, Andrew, Pierre, Jean-Baptiste, Thierry, Andy, Jérôme, Benoît I, Benoît II et Véronique.

Bravo à toutes celles et tous ceux de la Smala pour leur pêche, leur créativité et leur fidélité malgré la diaspora. Votre amitié est comme un cadeau qui, lorsqu'on en défait l'emballage, transforme la surprise d'un instant en gaîté, et la gaîté en émerveillement.

Bravo à mes amis Fabienne et Olivier, Florence et Sylvain, Franck et Laurence, Blanche et Alexis, Gyöngyi, Kendra, Anne Wisner, Gilles, Yann, Alaric et Barbara, Séverine et Didier, Sandrine, Isa, Carine, Flavien... pour leurs parcours. A vous tous, parce que nos retrouvailles seront toujours un plaisir, je dis simplement Merci... et je croise les doigts pour que souvent se croisent nos routes.

Bravo à Bia pour être, dans l'adversité comme dans l'amitié : patiente, généreuse et sage.

Je dédie ce manuscrit à p'tit' Lu (*je dis M*)

à ma *very dear* Hortense dont le peps et l'optimisme sont un *tonic* de rêve
à Joëlle et Raymond, mes parents, que je remercie du fond de mon coeur
à Pauline, Cha' et Gregou qui ont si bien grandi depuis que je suis parti
à ma Grand-Mère et ma Mamie : je pense souvent à vous souvent (*bis*)

à la mémoire de Paul Maillard et de Bernard Boulet,
l'ingéniosité du premier,
leur curiosité à tous deux.

Tout bouge, et l'on dirait les horizons en marche.

Emile Verhaeren

Summary

The glycoprotein (G) of rabies virus (RV) is the only viral protein at the surface of the virus. It is made of a globular head and a stem. G has two functions. As a first step it binds to receptors for RV that are present on the target cell. Then, after endocytosis, the protonation of G triggers its refolding and induces membrane fusion.

Our work focused on the folding of G, following two axes. In the first part, we characterized the effect of membrane anchorage on the folding of the ectodomain. Different anchors were substituted to the original transmembrane domain (TMD) and the conformation of the ectodomain was analysed with a set of monoclonal antibodies. We could conclude that the role of the TMD is to ensure a distance that is optimal between the ectodomain and the membrane environment. Otherwise, the ectodomain folds under an alternative conformation. We inferred that the ectodomain of G interacts with the membrane and that this interaction is necessary for the native conformation to be reached.

Mutagenesis in the membrane-proximal domain situated ahead of the TMD allowed to identify two motifs potentially important to discriminate between native and alternative folding : His-Pro₃₉₇₋₃₉₈ and Asp-Glu-Ala-Glu-Asp₄₁₀₋₄₁₄. The second axis we followed is the structural characterization of two peptides encompassing the membrane proximal region. Peptides produced in bacteria were subjected to complementary spectroscopic techniques which suggested that their structure depends on an external contribution, either from a different part of the protein or from the membrane.

As a third part, a test has been designed to study the fusion between transfected cells. It allowed us to perform a functional characterization of the mutants that had been constructed and to specify the role of different parts of G in the fusion process it induces.

Keywords : Rhabdovirus, rabies, glycoprotein, folding, alternative conformation, peptide, spectroscopy, membrane fusion

Sommaire

Introduction

1. La rage	p. 1
1.1 Epidémiologie de la rage	p. 1
1.2 Pathogenèse de la rage	p. 2
1.3 Prophylaxie de la rage	p. 5
2. Le virus rabique : phylogénie, structure et biologie	p. 7
2.1 Classification et parentèle	p. 7
2.1.1 La famille des <i>Rhabdoviridae</i>	p. 7
2.1.2 L'ordre des <i>Mononegavirales</i>	p. 8
2.2 Composition et structure du virion	p. 9
2.2.1 Le génome viral	p. 9
2.2.2. Les protéines de la ribonucléocapside	p. 11
La nucléoprotéine N	p. 11
La protéine L	p. 12
La phosphoprotéine P	p. 13
2.2.3. L'enveloppe virale	p. 14
La membrane lipidique	p. 14
La protéine de matrice M	p. 15
La glycoprotéine G	p. 18
2.2.4. Protéines cellulaires présentes dans le virion	p. 19
2.3 Le cycle viral	p. 19
2.3.1 Liaison du virus à la cellule cible	p. 21
2.3.2 Pénétration du virus dans une cellule cible	p. 22

2.3.3 Transcription du génome et traduction	p. 22
2.3.4 Réplication	p. 24
2.3.5 Assemblage et bourgeonnement	p. 26
3. Protéine G du virus rabique et fusion membranaire	p. 27
3.1. Caractéristiques de la fusion médiée par G	p. 27
3.2. Bases structurales de la fusion médiée par G	p. 28
3.2.1. L'ectodomaine de G peut adopter plusieurs conformations	p. 28
3.2.2. La fusion membranaire est un processus multi-étape	p. 31
3.2.3. La fusion membranaire est catalysée par un complexe multiprotéique	p. 34
3.3. G est une protéine de fusion originale	p. 35
4. Structure et repliement de G	p. 40
4.1. Structure et biosynthèse de G	p. 41
4.1.1. Structure de la G du VR	p. 41
4.1.2. Biosynthèse de G	p. 43
4.2. Repliement de G	p. 43
4.2.1. Généralités sur le repliement des protéines	p. 44
Renaturation <i>in vitro</i>	p. 44
Repliement <i>in vivo</i>	p. 45
Repliement dans l'environnement du RE	p. 46
4.2.2. Effet de la glycosylation sur la sécrétion de G	p. 47
4.2.3. Effet du repliement de G sur sa sécrétion	p. 48
4.2.4. Rôle des N-glycanes dans le repliement de G	p. 49
4.3. Contrôle de la qualité du repliement	p. 50
4.3.1. Rétention des polypeptides mal repliés : une particularité du RE	p. 50
4.3.2. Des chaperons spécialisés assistent le repliement des glycoprotéines	p. 51
4.3.3. Les chaperons du RE forment une matrice capable d'assister le repliement	p. 53
4.4. G est un modèle dans l'étude du repliement	p. 54
5. Objet de ce travail	p. 55

Matériels & Méthodes

1. Bactéries et biologie moléculaire

1.1. Bactéries hôtes, plasmides et transformation	p. 57
1.2. Milieux de culture des bactéries	p. 57
1.3. Préparation des bactéries compétentes	p. 58
1.4. Transformation des bactéries compétentes	p. 58
1.5. Clonages : PCR, digestions, purifications	p. 58
1.5.1. Digestions et ligations	p. 58
1.5.2. Conditions des PCR	p. 59
1.5.3. Préparation des plasmides et des fragments d'ADN	p. 59
1.6. Analyses	p. 60
1.6.1. Gel d'agarose	p. 60
1.6.2. Séquençage	p. 60

2. Virus et cellules, biologie cellulaire

2.1. Virus	p. 60
2.2. Culture de cellules eucaryotes	p. 60
2.3. Infection et transfection des cellules	p. 61
2.3.1. Infection par le VR (pour la production de Gs)	p. 61
2.3.2. Transfection au Transfectace	p. 61
2.3.3. Transfection au phosphate de calcium (Parker et Stark, 1979)	p. 62
2.4. Marquage des protéines au ³⁵S	p. 62
2.4.1. Marquage bref	p. 62
2.4.2. Marquage long (préparation de Gs et de virus radioactifs)	p.62
2.5. Immunofluorescence	p. 62
2.6. Test de fusion cellulaire	p. 63
3. Biochimie	p. 63
3 .1.Tampons	p.63

3.2. Electrophorèses	p. 64
3.2.1. Tampons d'électrophorèse	p. 64
3.2.2. Gels de polyacrylamide	p. 65
3.3. Anticorps et immunoprécipitations	p. 65
Anticorps	p. 65
Immunoprécipitations	p. 66
Test d'oligomérisation	p. 66
3.4. Enzymes et réactifs, protocoles des tests enzymatiques	p. 66
Test de réactivité vis-à-vis de l'endo H	p. 66
Test de sensibilité à la PI-PLC	p. 66
3.5. Purification des peptides P_L et P_S	p. 66
Induction de la production des peptides par les bactéries en culture	p. 66
Purification des protéines de fusion avec la GST	p. 67
Purification des peptides P _L et P _S	p. 67
4. Biophysique	
4.1. Ultracentrifugation analytique à l'équilibre	p. 67
4.2. Dichroïsme circulaire	p. 68
4.3. Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier	p. 68
4.4. Résonance magnétique nucléaire	p. 69

Chapitre 1

Rôle du domaine transmembranaire dans le repliement de l'ectodomaine de G

1. La nature de l'ancrage est-elle importante?	p. 71
1.1. Conséquences de l'ancrage membranaire	p. 71
1.2. Substitution d'une ancre GPI au DTM.	p. 73

2. L'ancrage TM participe-t-il à la structure IV de G?	p. 76
2.1. Propriétés structurales du DTM	p. 76
2.2. Remplacement du DTM de la G du VR par un DTM étranger	p. 76
3. Le domaine TM est-il un noyau de repliement?	p. 77
3.1. Nucléation d'une hélice dans la phase lipidique	p. 77
3.2. Remplacement du DTM par un coiled-coil trimérique	p. 78
3.3. Insertion d'un briseur d'hélices en amont du DTM.	p. 79
4. Rôle indirect du DTM dans le repliement de G	p. 81
4.1 Insertion de l'oligopeptide de l'ancre GPI	p. 81
4.2 Insertion d'un espaceur peu structuré de grande taille	p. 81
5. Conclusion.	p. 84

Chapitre 2

Rôle de la région juxtamembranaire dans la flexibilité conformationnelle de G

1. Préparation de fragments recombinants de la tige de G	p.88
1.1 Conception des peptides et choix du système d'expression	p. 89
1.2 Purification des peptides PL et PS	p. 90
1.3. Caractérisation de PL et PS par ultracentrifugation à l'équilibre	p. 91
2. Etude spectroscopique de PL et PS à pH 5 et pH 8	p. 92
2.1 Dichroïsme circulaire	p. 92
2.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	p. 94
3. Caractérisation structurale de PS	p. 96
3.1. RMN	p. 96
3.2. Effet d'un cosolvant	p. 98

3.3. Bilan	p. 99
4. Rôle de la région 396-438 dans le repliement de G	p. 100
4.1. Dissection de la région juxtamembranaire	p. 101
4.1.1. Identification des résidus conservés dans la région juxtamembranaire de G	p. 101
4.1.2. Altération des résidus conservés dans la région juxtamembranaire	p. 101
4.1.3. Bilan	p. 103
4.2. Rôle du motif His-Pro₃₉₇₋₃₉₈ dans le repliement de G	p. 104
4.2.1. Signification du motif His-Pro	p. 104
4.2.2. Mutagenèse du motif His-Pro	p. 104

Chapitre 3

Participation du domaine transmembranaire et de la région juxtamembranaire externe à la fusion membranaire

1. Mise au point d'un test de fusion cellulaire	p. 107
1.1. Différents tests de fusion de cellules	p. 107
1.2. Choix d'un test fiable	p. 108
1.2.1. Fusion de cellules infectées avec le virus de la vaccine	p. 108
1.2.2. Fusion de cellules transfectées sans virus de la vaccine	p. 110
2. Mutagenèse du domaine TM	p.110
2.1. Rôle du domaine TM dans la fusion	p. 110
2.2. Influence de la nature du DTM sur la fusion membranaire	p. 112
2.3. Importance de la connexion entre l'ectodomaine et le DTM	p. 114
3. Mutagenèse de la région juxtamembranaire	p. 114
3.1. Mutagenèse des résidus jouxtant le DTM	p. 114
3.2. Mutagenèse du motif His-Pro ₃₉₇₋₃₉₈	p. 115

4. Conclusion

p. 115

Discussion

Hypothèse d'une interaction entre l'ectodomaine de G et la membrane.	p. 117
Comment identifier les résidus de G qui interagiraient avec la membrane?	p. 118
La membrane influence-t-elle la conformation de G de façon transitoire ou permanente?	p. 119
Conséquences fonctionnelles d'une influence permanente?	p. 120
Rôle du motif His-Pro397-398 dans la transition structurale induite à bas pH	p. 121

Références Bibliographiques

p. 124

Annexe

Article paru dans le cahier n°3 (avril 2001) des *Ecoles Physique et Chimie du Vivant - Membranes biologiques* (pp. 71-78) p. 150

Les changements de conformation des glycoprotéines virales fusogènes.

Liste des tableaux et des figures

Tab. 1 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés pour caractériser la conformation de G.	p. 74
Tab. 2 : Produit de la déconvolution des spectres DC de P _L à pH 8 et pH 5.	p. 93
Tab. 3 : Résultat de la déconvolution des spectres IR enregistrés pour P _L et P _S à pH 8 et à pH 5.	p. 95
Tab. 4 : Produit de la déconvolution des spectres DC enregistrés pour P _S , à concentration croissante en TFE.	p. 98
Tab. 5 : Liste des protéines G mutantes présentées dans ce manuscrit.	p. 117
Fig. 1 : Progression de l'infection après inoculation du virus de la rage à une souris.	p. 3
Fig. 2 : Morphologie des principaux virus à ARN simple brin de polarité négative.	p.8
Fig. 3 : Morphologie d'un rhabdovirus (microscopie électronique).	p. 9
Fig. 4 : Schéma du génome du virus de la rage.	p. 10
Fig. 5 : Ecorché du virion rabique (quantité des protéines d'après Flamand et al., 1993).	p. 11
Fig. 6 : Représentation schématique de la protéine P.	p. 13
Fig. 7 : Morphologie de la protéine G (d'après Gaudin et al., 1992).	p. 16
Fig. 8 : Structure covalente de la protéine G du virus de la rage (PV).	p. 17
Fig. 9 : Cycle cellulaire du virus de la rage.	p. 20

Fig. 10 : Schéma de la transcription des Rhabdovirus.	p. 23
Fig. 11 : Schéma de la réplication des Rhabdovirus.	p. 25
Fig. 12 : La protéine G existe sous plusieurs conformations en équilibre.	p. 29
Fig. 13 : Forme des lipides et rayon de courbure.	p. 31
Fig. 14 : Fusion membranaire.	p.32.
Fig. 15 : Hémifusion.	p. 33
Fig. 16 : Structure de HA du virus influenza.	p. 35
Fig. 17 : Structures comparées de HA2 à pH 7 et à pH 5.	p. 36
Fig. 18 : Structures comparées de différentes protéines fusogènes virales et cellulaires.	p. 38
Fig. 19 : Structure de l'ectodomaine de la protéine E du TBEV à pH 7 (Rey et al., 1995).	p. 39.
Fig. 20 : Glycosylation de la protéine G.	p. 42
Fig. 21 : Description énergétique du repliement d'un polypeptide.	p. 45
Fig. 22 : Etapes de la sécrétion de la protéine G.	p. 48
Fig. 23 : Contrôle-qualité du repliement des glycoprotéines dans le RE.	p. 53
Fig. 1.1 : Rôle de l'ancrage membranaire dans le repliement de l'ectodomaine de G.	p. 70
Fig. 1.2 : Conséquences de l'ancrage membranaire sur l'oligomérisation.	p. 71
Fig. 1.3 : Séquence et représentation schématique des différentes protéines G mutantes du chapitre 1.	pp. 72-73
Fig. 1.4 : Caractérisation de GGPI.	p. 75
Fig. 1.5 : Antigénicité des chimères Gp75 et GgC.	p. 77
Fig. 1.6 : Caractéristiques des chimères G _{ij} GCN4.	p. 79
Fig. 1.7 : Insertion d'un oligopeptide entre l'ectodomaine et le DTM.	p. 80
Fig. 1.8 : Analyse des chimères de cette étude en gradient 5-20 % de saccharose.	p. 82

Fig. 1.9 : Immunofluorescence de surface.	p. 83
Fig. 1.10 : Proposition d'une représentation de la protéine G.	p. 87
Fig. 2.1 : Schéma des constructions P _L et P _S .	p. 89
Fig. 2.2 : Purification des peptides P _L et P _S .	p. 90
Fig. 2.3 : Ultracentrifugation à l'équilibre de P _L .	p. 91
Fig. 2.4 : Etude de P _L par dichroïsme circulaire.	p. 93
Fig. 2.5 : Etude du peptide P _L par spectroscopie IR-TF.	p. 94
Fig. 2.6 : Effet du TFE sur le spectre dichroïque de P _S .	p. 97
Fig. 2.7 : Alignement des séquences juxtamembranaires de l'ectodomaine de G.	p. 102
Fig. 2.8 : Antigénicité de GW437Y, GW437D, GW437I.	p. 102
Fig. 2.9 : Mutagenèse du groupe de résidus acide.	p. 103
Fig. 2.10 : Antigénicité des mutants du motif His-Pro397-398.	p. 105
Fig. 3.1 : Colocalisation de G et de P-GFP après cotransfection.	p. 108
Fig. 3.2 : Validation du test de fusion de cellules transfectées.	p. 109
Fig. 3.3 : Propriétés fusogènes de GGPI.	p.111
Fig. 3.4 : Propriétés fusogènes des chimères de G dont l'ancrage est modifié.	p. 111
Fig. 3.5 : Caractérisation de GGA-LL.	p. 113
Fig. 3.6 : Propriétés fusogènes des chimères de G dont la région juxtamembranaire a été mutée.	p. 113

Introduction

1. La rage	p. 1
2. Le virus rabique : phylogénie, structure et biologie	p. 7
3. Protéine G du virus rabique et fusion membranaire	p. 27
4. Structure et repliement de G	p. 40
5. Objet de ce travail	p. 55

Introduction

La rage est une maladie mortelle touchant tous les mammifères. A partir de 1881, Pasteur a mis en évidence la spécificité de certaines des propriétés de l'agent de la rage par rapport aux "microbes" mais la définition du concept de virus fut posée par Beijerinck en 1898, à partir d'un modèle plus simple et plus commode, celui de la mosaïque du tabac. La rage reste cependant associée aux débuts de la virologie grâce aux travaux de Pasteur et de Galtier qui ont abouti à la mise au point d'une "méthode pour prévenir la rage après morsure" (Pasteur, 1885), qui fut l'un des premiers succès de la vaccination. Ainsi, alors même que la notion de virus était inconnue, il devint possible de prévenir la rage et de lutter contre son agent. La virologie se développa ultérieurement, aux confins de l'immunologie et de la microbiologie.

1. La rage

1.1 Epidémiologie de la rage

La rage tue encore de nos jours. Ce sont les pays en voie de développement et les pays à forte population rurale, comme l'Inde, qui connaissent le plus grand nombre de victimes. Ainsi, entre 35000 et 50000 décès ont été enregistrés en 1997 dans le monde entier, mais quelques dizaines de cas seulement concernent les pays occidentaux. L'infection des humains résulte le plus souvent de la morsure par un animal enragé. Ce mode d'inoculation explique que parmi les espèces susceptibles de développer la rage, quelques unes seulement sont capables de la transmettre efficacement et sont donc vectrices. Le vecteur le plus souvent impliqué, partout dans le monde, est un chien errant. Dans quelques cas exceptionnels, la contamination a eu lieu par l'exposition d'une muqueuse au virus :

l'inhalation d'aérosols chargés en particules virales dans l'atmosphère humide d'une grotte texane où vivait une importante colonie de chauve-souris infectées a fait une victime (Winkler, 1968) et un vétérinaire est mort pour avoir inhalé des aérosols alors qu'il participait à la préparation d'un lot de vaccins (Winkler *et al.*, 1973). Dans ce dernier cas, l'homme avait été vacciné mais la protection vaccinale avait été perdue après plusieurs années sans exposition au virus.

Les études épidémiologiques distinguent la rage des rues, transmise par les chiens, et la rage sylvatique, transmise par différents mammifères vivant dans les forêts (les renards en Europe ; mouffettes et rats-laveurs en Amérique du Nord...). Le principal danger pour les hommes est associé à la rage des rues mais la rencontre entre animaux domestiques et sauvages crée un lien entre les deux cycles épidémiologiques. L'éradication de la rage des rues a ainsi permis de réduire à zéro le nombre d'infections endogènes en France et plus généralement en Europe occidentale. La lutte se poursuit au prix d'une grande vigilance vis-à-vis de la rage des rues et du contrôle de la rage sylvatique. Ces efforts sont accrus dans certaines régions reconnues sensibles, comme les départements de l'est de la France qui, en 2000 encore, étaient officiellement touchés par la rage. Par ailleurs un effort européen a été nécessaire, les seuls pays épargnés étant le Royaume-Uni, l'Espagne et le Portugal, qui sont protégés par leurs frontières naturelles.

1.2 Pathogenèse de la rage

La rage a été identifiée dès l'Antiquité. La transmission par les chiens enragés était reconnue, et les symptômes de la maladie, en particulier la démence et l'hydrophobie, avaient déjà été décrits. La nature infectieuse de la maladie fut établie au début du 19^e siècle par Zinke (1804) et Magendie et Breschet (1821) qui infectèrent expérimentalement des animaux sains en appliquant la salive d'animaux ou d'humains malades sur des plaies (pour revue : Wunner, 1987).

Le développement de la maladie et l'apparition des signes cliniques sont précédés par une période d'incubation allant de quelques jours à plusieurs années (pour revue : Dietzschold *et al.*, 1996). Pasteur et ses collaborateurs découvrirent le rôle du système nerveux central (SNC) alors qu'ils cherchaient une voie infectieuse plus efficace. L'injection intracérébrale de matériel prélevé dans le SNC d'un animal malade permettait en effet de réduire la période d'incubation à 1-3 semaines.

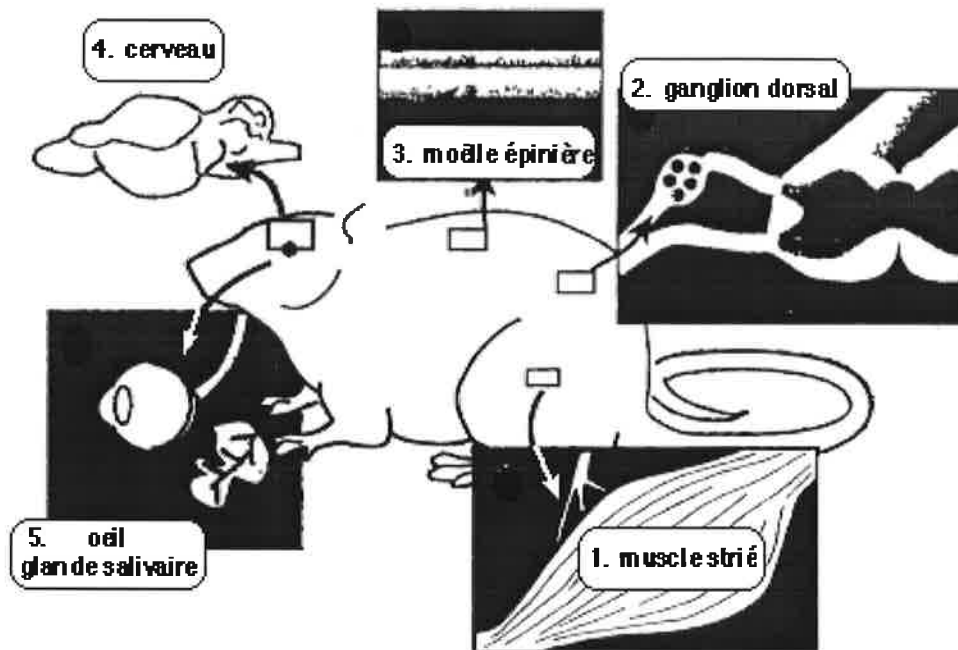


Fig. 1 : Progression de l'infection après inoculation du virus de la rage à une souris. 1. Le virus inoculé se multiplie faiblement dans les tissus périphériques, notamment musculaires ; après avoir infecté les neurones de la jonction neuromusculaire, le virus entame sa progression par transmission synaptique de neurone à neurone. 2. Réplication du virus dans le ganglion dorsal puis la moëlle épinière. 3. Propagation du virus *via* les neurones de la moëlle épinière. 4. Infection de l'encéphale. 5. Infection d'organes périphériques : rétine, cornée, glandes salivaires...

La maladie se développe dans le système nerveux, quoique de grandes quantités de virus s'accumulent dans certains organes périphériques en phase terminale, en particulier dans les glandes salivaires (Murphy *et al.*, 1973b). La voie d'inoculation la plus fréquente étant la morsure, le virus doit entrer dans le SNC afin que l'infection soit effective (**Fig. 1**). Le virus est transitoirement confiné au point d'inoculation, ce qui permet de sauver des souris infectées à l'extrémité de la patte, en procédant à l'amputation du pied jusqu'à 18 jours post-inoculation (Baer et Cleary, 1972). Cette observation a été confirmée par immunofluorescence : Murphy et ses collaborateurs ont montré que la propagation du virus le long des voies nerveuses est précédée par une phase de multiplication au site de la plaie dans des tissus périphériques, notamment des tissus musculaires (Murphy et Bauer, 1974). De son côté, l'équipe de Henri Tsiang a constaté qu'un isolat sauvage du VR, mais pas la souche fixée CVS, est capable d'infecter des myotubes de rat en culture (Tsiang, 1988). Il est clair que l'aptitude des isolats sauvages à se multiplier localement -quoique de façon limitée- augmente significativement leur infectiosité par rapport aux souches fixées, qui en sont incapables (Murphy *et al.*, 1973a ; Murphy et Bauer, 1974). C'est cette phase qui est limitante dans le développement de la maladie et c'est aussi

elle qui rend possibles les traitements après exposition.

Le point le plus remarquable de la propagation du virus est son caractère transsynaptique : une fois qu'il a pénétré dans le système nerveux périphérique, le virus progresse le long des voies nerveuses de neurone en neurone, comme l'illustrent des études où le virus de la rage a été utilisé comme traceur neuronal (Ugolini, 1995). Ce mode de transmission pourrait contribuer de façon significative à la virulence. En effet des virus avirulents provoquant une invasion ralentie du SNC ont été trouvés déficients dans le transfert direct de cellule à cellule, en culture de neuroblastomes (Dietzschold *et al.*, 1985). Ces mutants avirulents sont caractérisés par la mutation de l'arginine 333 de la protéine d'enveloppe du virus en un résidu non basique (Dietzschold *et al.*, 1983 ; Seif *et al.*, 1985) ; cette arginine paraît donc essentielle pour la virulence du VR (Tuffereau *et al.*, 1989).

L'infection du SNC entraîne une série de perturbations neurologiques et de modifications comportementales liées à des manifestations alternées de dépression et de violence. Les recherches visant à élucider l'origine d'un comportement violent ont donné le jour à plusieurs hypothèses impliquant diverses régions cérébrales et divers neurotransmetteurs (pour revue : Enserink, 2000). Malheureusement, les recoupements entre ces résultats et ceux obtenus en étudiant l'effet de l'infection rabique sur l'activité de différentes populations de neurones sont d'autant plus difficiles à analyser que peu de neurones échappent à l'infection (pour revue : Charlton, 1994).

Les causes de la mort sont également obscures. Plusieurs hypothèses sont proposées (pour revues : Wunner, 1987 ; Charlton, 1994 ; Dietzschold *et al.* 1996). Premièrement, les perturbations neurologiques entraînent la perte de certains réflexes, ce qui pourrait suffire à tuer le malade. Deuxièmement : le rôle de la réponse immunitaire dans la pathogenèse est illustré par l'effet salvateur de l'immunosuppression et par l'effet aggravant de l'immunothérapie dans divers modèles expérimentaux de la rage (pour revue : Nathanson et Gonzales-Scarano, 1991). En règle générale, on admet que l'effet de la réponse immunitaire peut être bénéfique ou délétère selon les cinétiques respectives de l'infection et de la mise en place de la réponse. Par ailleurs, des données provenant de souches et de systèmes expérimentaux disparates mettent en avant le rôle de la réponse immunitaire dans l'orientation de la maladie vers sa forme paralytique chez la souris et peut-être chez l'homme (pour revue : Charlton, 1994).

Le troisième et dernier niveau d'étude décrit les effets cellulaires de l'infection. La présence éventuelle d'inclusions éosinophiles de 1 μm à 30 μm de diamètre dans les neurones infectés par le

VR est un signe caractéristique de la rage. Cette observation fut rapportée par Negri (1903) et servit longtemps à établir le diagnostic d'une infection par le VR, avant le développement des tests par immunofluorescence qui sont plus fiables. Au-delà de l'apparition -non systématique- de ces inclusions, le virus de la rage est réputé avoir peu d'effet cytopathogène sur des cellules en culture. Toutefois, la dégénérescence de certaines populations de neurones a été observée *in vivo* (pour revue : Wunner, 1987) et des résultats isolés témoignent d'un lien entre infection par le VR et apoptose (Jackson et Rossiter, 1997 ; Ubol et Kasisith, 2000). Enfin, l'infection se manifeste plus finement par une modulation de l'expression des récepteurs de certains neurotransmetteurs (pour revue : Charlton, 1994). Ces observations, difficiles à interpréter, constituent probablement les bases moléculaires des troubles physiologiques et comportementaux associés à la rage.

1.3 Prophylaxie de la rage

Les quelques cas de guérison rapportés sont tous liés à des conditions exceptionnelles ; en général, une fois la maladie déclarée, son issue est fatale. Le VR échappe donc au système immunitaire dans la plupart des cas. Il n'est pas exclu que le VR soit capable de moduler la réponse immunitaire, cependant des caractéristiques comme une faible réplication au site d'inoculation et le neurotropisme sont propres à ralentir l'élaboration d'une réponse efficace. Le système nerveux est en effet particulier : son accessibilité est régulée, les anticorps et les protéines du complément y sont sous-représentés et les neurones eux-mêmes sont déficients dans la présentation des antigènes par le CMH I, dont le rôle est de présenter en permanence au système immunitaire un échantillon des protéines synthétisées par la cellule (pour revue : Whitton et Oldstone, 1996). Ces caractéristiques contribuent certainement à rendre l'élimination du virus plus difficile.

La première technique de lutte contre la rage fut aussi l'un des succès scientifiques les plus retentissants, comme en témoigne l'aura persistente de Louis Pasteur, quelque 115 ans plus tard. Pasteur utilisa ses résultats pour mettre au point une "méthode de prévention de la rage après morsure" (1885) dont le bénéfice fut apporté au monde entier à travers le réseau des instituts Pasteur. Des préparations à base de moëlle de lapins infectés lentement desséchées étaient inoculées aux patients ; il s'agissait en fait de l'injection du virus inactivé. Ce vaccin n'était pas sans danger : des réactions allergiques violentes étaient parfois provoquées chez le patient et des cas de rage ont été

rapportés, par suite de l'injection de virus imparfaitement inactivé. Depuis les années 1960 cette préparation est remplacée dans la plupart des pays par d'autres, à base de virus propagé en culture de cellules et tué chimiquement. Seuls certains pays en voie de développement ont encore recours aux anciennes préparations, moins onéreuses. Enfin, étant donné l'importance du contrôle de la rage sylvatique, des vaccins oraux ont été développés pour les animaux sauvages.

La protection conférée par les vaccins antirabiques est essentiellement assurée par les anticorps dirigés contre la protéine de surface. L'administration de serum antiviral permet de lutter contre l'infection et est recommandée dans les traitements après exposition (pour revue : Dietzschold *et al.*, 1996). Ces anticorps sont susceptibles de provoquer l'agglutination des virions, donc de réduire le nombre d'unités infectieuses. Ils sont aussi capables de recouvrir les particules virales et de les neutraliser (Flamand *et al.*, 1993) : cette propriété a été très étudiée et a été utilisée *ex vivo* pour sélectionner des mutants (Seif *et al.*, 1985 ; Préhaud *et al.*, 1988 ; Benmansour *et al.*, 1991 ; Raux *et al.*, 1995). Dans les deux cas cités plus haut, les anticorps agissent de manière autonome ; les anticorps anti-protéine G peuvent aussi marquer les cellules infectées qui présentent G à leur surface : les cellules marquées sont alors détruites par des macrophages ou bien par le système du complément.

Les vaccins actuellement disponibles contre la rage sont efficaces. Toutefois, à l'exception des vaccins destinés aux animaux sauvages, qui sont vivants, la protection s'estompe rapidement de sorte que des rappels sont fréquemment nécessaires (annuels chez les chiens domestiques). L'absence de mémoire immunitaire est un problème souvent rencontré avec les vaccins "inertes" et n'a pas encore trouvé d'explication (pour revue : Whitton et Oldstone, 1996). Deuxième problème : les vaccins antirabiques actuels sont efficaces contre les VR du génotype 1, qui sont répandus mondialement, mais pas contre des virus isolés plus récemment en Afrique. Pour pallier ce manque, le développement d'un vaccin multivalent, plus économique qu'un nouveau vaccin à champ d'application réduit, est à l'étude (Desmézières *et al.*, 1999 ; Jallet *et al.*, 1999). Enfin, les recherches actuelles essaient de mettre à profit le potentiel immunogène de la protéine N. Celle-ci déclenche en effet une réponse immunitaire significative, capable de renforcer la réponse induite par G (Dietzschold *et al.*, 1987). Or la conservation de N est forte entre les différents génotypes (pour revue : Bourhy *et al.*, 1993) de sorte qu'elle pourrait renforcer la réponse immunitaire déclenchée après exposition à des virus de quelque génotype que ce soit. Les recherches actuelles s'orientent vers l'élaboration d'un

vaccin sous-unitaire contenant la protéine G recombinante mais l'avantage que pourrait conférer l'addition de la protéine N à un vaccin est encore spéculatif (Drings *et al.*, 1999).

2. Le virus rabique : phylogénie, structure et biologie

2.1 Classification et parentèle

La classification des virus s'appuie sur plusieurs critères, au premier rang desquels figurent la nature du génome, sa structure et celle du virion ; des caractéristiques du cycle viral en complètent éventuellement la liste.

2.1.1 La famille des *Rhabdoviridae*

La rage est le prototype du genre des Lyssavirus, qui appartient à la famille des *Rhabdoviridae*. Outre les Lyssavirus, cette famille regroupe les Vésiculovirus, les Ephémérovirus, les Novirhabdovirus, les Nucléorhabdovirus et les Cytorhabdovirus. Ces virus sont largement distribués dans la nature.

Leur spectre d'hôtes est en général très large même si certains se sont adaptés à un groupe particulier (légende de la **Fig. 2**). Ainsi, lors d'une épizootie de stomatite vésiculaire dans le Colorado en 1982, des virions de la même souche du VSV ont été isolés à partir de mouches et de chevaux (Schnitzlein et Reichmann, 1985). Il ne fut pas possible d'en déduire si le virus était passé d'un hôte à l'autre, toutefois, exception faite des rhabdovirus provoquant la rage ou s'attaquant aux poissons, la plupart de ces virus semblent être transmis par des arthropodes. Certains auteurs soupçonnent même les arthropodes d'être la niche écologique d'origine des Rhabdovirus.

Le groupe des Rhabdovirus présente une morphologie remarquable qui, à elle seule, a permis de classer de nombreux virus dont la caractérisation plus fine est toujours en attente (**Fig. 2**). Au-delà de cette ressemblance structurale, les correspondances fonctionnelles entre les différentes protéines des virus de cette famille, sont communément admises (pour revue : Dietzschold *et al.*, 1996). C'est pourquoi des résultats concernant le VSV seront parfois utilisés pour compléter ceux qui ont été obtenus avec le VR : ce sera en particulier le cas dans les paragraphes concernant la réplication et

l'expression virale (2.3.), car le VSV a servi de modèle pour l'ensemble des *Mononegavirales*.

La ressemblance évoquée est globale : elle n'empêche pas une divergence significative des séquences peptidiques. Par exemple, au sein même des Lyssavirus, les protéines les plus divergentes sont la phosphoprotéine et la glycoprotéine avec respectivement 47% et 58% de similarité entre les produits des génotypes les plus distants : PV et Mokola (Bourhy *et al.*, 1993 ; Tordo *et al.*, 1993). La divergence est plus forte encore au sein des Vésiculovirus (pour revue : Dietzschold *et al.*, 1996).

Enfin, il faut noter qu'en plus de la menace que les Lyssavirus font peser localement sur la santé publique, les Vésiculovirus et les Novirhabdovirus occasionnent des pertes économiques significatives en matière de production animale (pour revue : Wagner et Rose, 1996).

2.1.2 L'ordre des *Mononegavirales*

Le génome des Rhabdovirus est une molécule d'ARN. L'ARN génomique est fait d'un simple brin, complémentaire des ARN messagers. Sa polarité est donc négative : à ce titre les *Rhabdoviridae* font partie de l'ordre des *Mononegavirales* qui englobe aussi les *Paramyxoviridae* (virus Sendaï), les *Bornaviridae* (virus de la maladie de Borna) et les *Filoviridae* (virus Ebola), dont le génome est également monopartite.

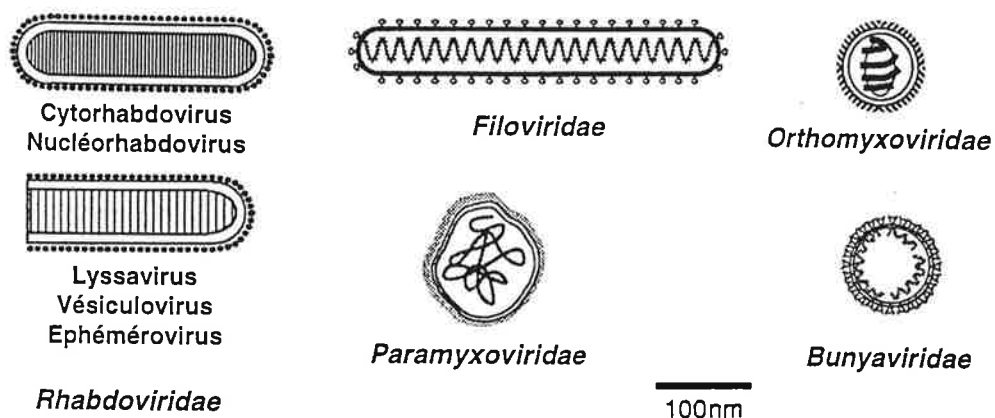


Fig. 2 : Morphologie des principaux virus à ARN simple brin de polarité négative. Les Lyssavirus sont susceptibles d'infecter tous les mammifères. Le spectre d'hôtes des Vésiculovirus comprend mammifères, poissons et arthropodes. Les Ephémérovirus infectent le bétail. Les Novirhabdovirus infectent les poissons. Les Nucléorhabdovirus et les Cytorhabdovirus infectent les plantes (pour revue : Dietzschold *et al.*, 1996). Les *Orthomyxoviridae* et les *Bunyaviridae* se distinguent des *Mononegavirales* par leur génome segmenté.

A côté de ces deux familles, certains virus au génome segmenté sont considérés comme de proches parents des *Rhabdoviridae* : ce sont les *Orthomyxoviridae* (virus influenza) et les *Bunyaviridae* (virus de la fièvre de la vallée du Rift). Les *Mononegavirales* et leurs proches parents ont des morphologies différentes mais ce sont tous des virus enveloppés (**Fig. 2**).

2.2 Composition et structure du virion

L'observation du virus rabique au microscope électronique révèle une forme en obus, caractéristique des Rhabdovirus (Hummeler *et al.*, 1967). Certains virions dont l'enveloppe est abîmée montrent qu'une structure hélicoïdale est compactée à l'intérieur : il s'agit de la nucléocapside qui contient le génome (**Fig. 3**).

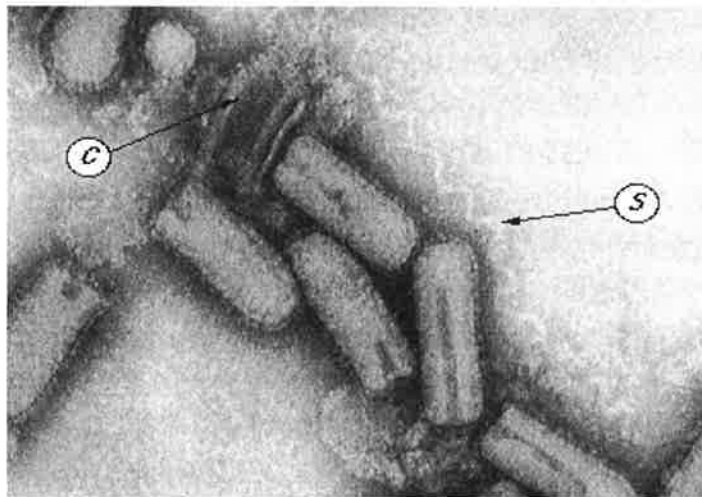


Fig. 3 : Morphologie d'un rhabdovirus (microscopie électronique - cliché d'après Wagner et Rose, 1996). Les dimensions d'une particule virale sont de l'ordre de 180 nm de longueur et 80 nm de diamètre. Sa surface est hérissée de spicules longues d'environ 8 nm. Un virion abîmé dévoile une structure toroïdale qui pourrait être la nucléocapside compactée (**C**). La nucléocapside dégagée du virion s'étire comme un serpent (**S**).

2.2.1 Le génome viral

Le génome est un ARN simple brin de polarité négative. Entièrement séquencé pour de nombreuses souches, il est long de 12 kb environ et comprend cinq gènes fonctionnels plus un pseudogène Ψ (Tordo *et al.*, 1986a, 1986b, 1988) (**Fig. 4**). La place de Ψ est celle qu'occupent le gène de la protéine NV chez les Novirhabovirus et le gène de la glycoprotéine non structurale des Ephémérovirus. Des séquences non traduites de quelques dizaines de résidus, présentes aux deux extrémités du génome et entre les gènes, contiennent des signaux de transcription ou de réplication

(pour revue : Conzelmann, 1998).

L'ordre des gènes est proche de celui observé chez les *Paramyxoviridae*. Nous verrons que cet ordre est en partie imposé par le mécanisme d'expression de ces virus. La place du gène dans le génome détermine en effet la quantité de protéine produite (2.3.3.).

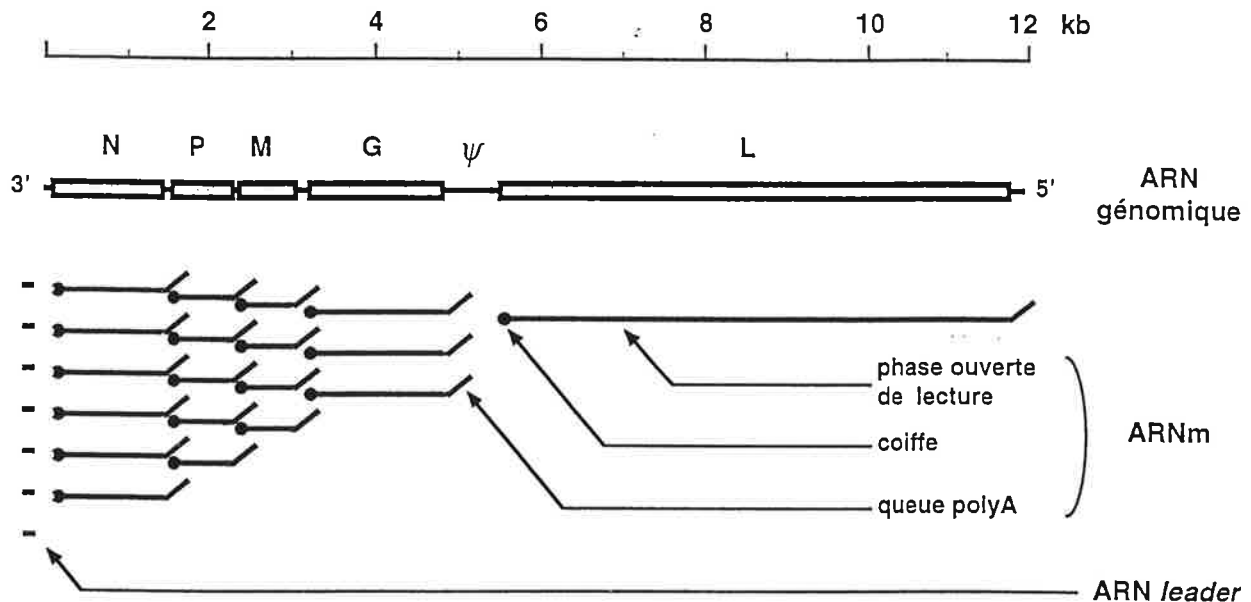


Fig. 4 : Schéma du génome du virus de la rage. L'ordre des gènes est typique des *Mononegavirales* : N code la nucléoprotéine, P la phosphoprotéine, M la protéine de matrice, G la glycoprotéine et L la polymérase. Ces protéines sont décrites dans la section 2.2.2.

L'existence depuis peu de systèmes de génétique inverse pour le VR, le VSV (pour revue : Conzelmann, 1998) et le IHNV (Biacchesi *et al.*, 2000) a permis aux expérimentateurs de poser des questions nouvelles pour comprendre l'organisation génomique des Rhabdovirus et ses conséquences. Par exemple, l'équipe de Gail Wertz a comparé l'efficacité répliquative et le pouvoir pathogène chez la souris de VSV recombinants obtenus en permutant différents gènes. La conclusion de ces travaux est que la place du gène N a un effet important sur l'efficacité répliquative et la létalité du VSV et que celle du gène G permet de moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Wertz *al.*, 1998 ; Flanagan *et al.*, 2000). L'absence de phénomènes de recombinaison chez les *Mononegavirales* garantit la stabilité des constructions, ce qui a permis à Wertz et ses collaborateurs de créer un vaccin vivant atténué contre le VSV, efficace chez la souris, en conjugant ces deux effets (Flanagan *et al.*, 2001).

Les virions contiennent les protéines codées par les gènes N, P, M, G et L (**Fig. 5**) ainsi que des protéines d'origine cellulaire. Les protéines virales ont été dénombrées et localisées au sein des particules du VSV et du VR à la suite de travaux de microscopie électronique et de biochimie (Thomas *et al.*, 1985 ; Barge *et al.*, 1993 ; Flamand *et al.*, 1993). Comme cela arrive souvent chez les virus, elles assument plusieurs fonctions.

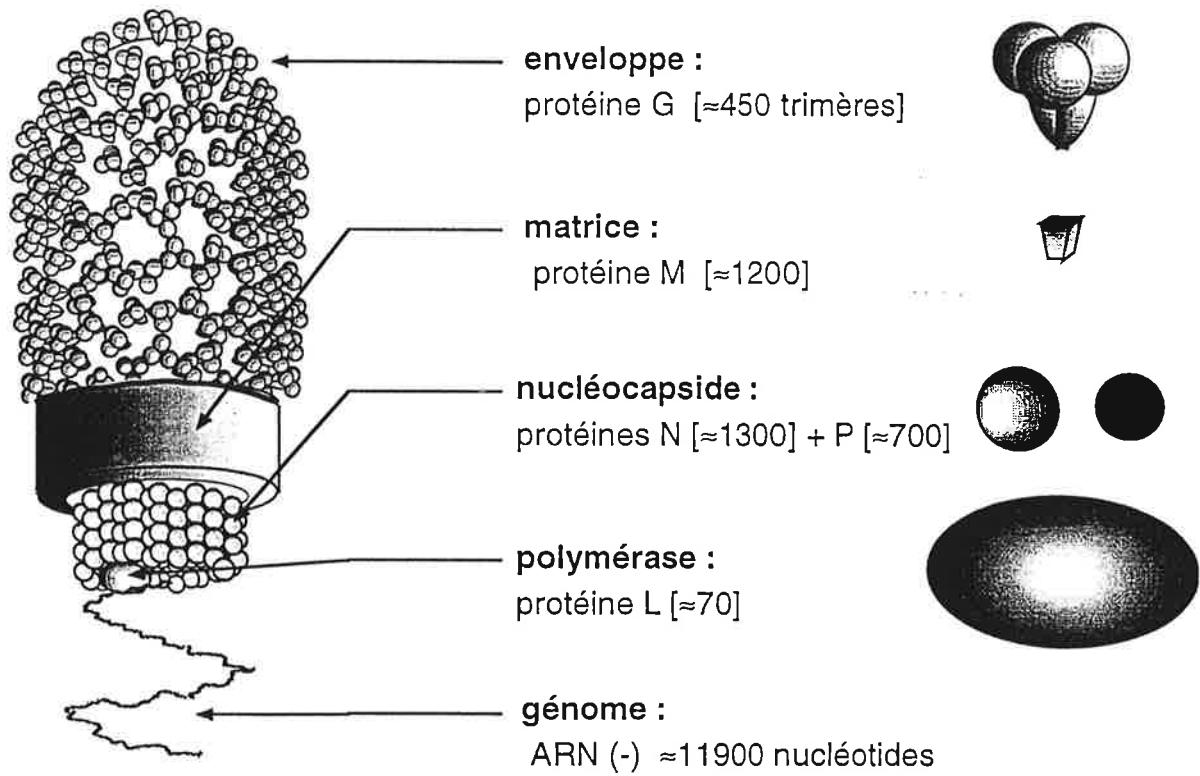


Fig. 5 : Ecorché du virion rabique (quantité des protéines d'après Flamand *et al.*, 1993). N : chaque capsomère couvre 9 nucléotides (Thomas *et al.*, 1985). L : conformément à son rôle catalytique, L est la protéine la moins abondante dans les cellules infectées et dans les particules virales.

2.2.2. Les protéines de la ribonucléocapside

La nucléocapside résulte de l'assemblage des protéines N, P et L autour de l'ARN génomique. Ces trois protéines sont indispensables à l'expression et à la réplication du génome.

La **nucléoprotéine N** (50 kDa ; 450 résidus) est remarquablement bien conservée chez les Rhabdovirus (Bourhy *et al.*, 1993), en particulier dans la région centrale qui contient le site d'interaction avec l'ARN (Kouznetzoff *et al.*, 1998). Cette protéine est le composant majeur des nucléocapsides, auxquelles elle donne une forme hélicoïdale (Iseni *et al.*, 1998) (**Fig. 3, 5**).

N encapside le génome et l'antigénome mais pas les ARN messagers (Blumberg *et al.*, 1983). L'encapsidation serait en effet initiée, et se propagerait à partir de séquences spécifiques, présentes à l'extrémité 5' de ces deux molécules (Moyer *et al.*, 1991 ; Yang *et al.*, 1998) ; le site d'interaction de N avec l'ARN est d'ailleurs sans équivalent parmi les protéines capables d'interagir avec des ARN (Kouznetzoff *et al.*, 1998). N protège l'ARN vis-à-vis de faibles concentrations de ribonucléases mais son rôle consisterait essentiellement à empêcher la formation de structures secondaires et à maintenir l'ARN dans un état favorable à la lecture par la polymérase (Iseni *et al.*, 2000 ; Schoehn *et al.*, 2001).

A cause du rôle structural fondamental de N, la réplication du VSV est régulée par la disponibilité de cette protéine (Patton *et al.*, 1984 ; Peluso et Moyer, 1988). Nous reviendrons sur cet aspect fonctionnel qui implique les protéines N et P dans la section **2.3.4**. Notons pour finir que contrairement à celle du VSV, la protéine N du VR est une phosphoprotéine et que la phosphorylation de la sérine 389 pourrait participer à la régulation de l'interaction de N avec l'ARN (Yang *et al.*, 1999).

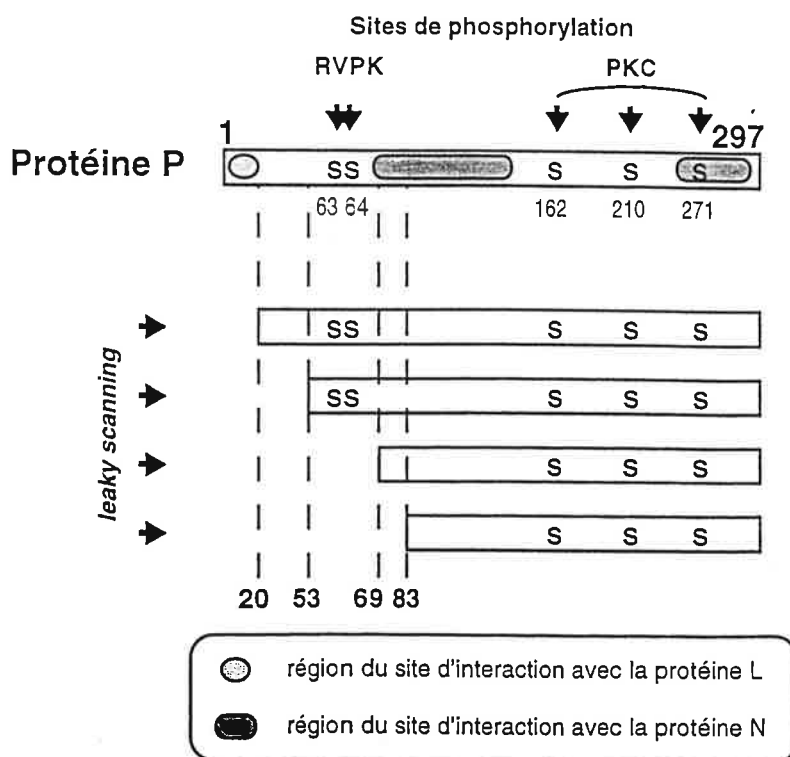
La **protéine L** (244 kDa) est longue de 2142 résidus, ce qui représente 60 % des séquences codantes du génome (**Fig. 4**). Cette très grosse protéine possède de nombreuses activités enzymatiques en rapport avec l'expression et la réplication du génome, mais elle ne peut fonctionner qu'au sein de la ribonucléocapside (Emerson et Wagner, 1972 ; Pattnaik et Wertz, 1990).

Emerson et Yu (1975) ont constaté que les protéines L et P sont nécessaires pour reconstituer *in vitro* l'ARN-polymérase ARN-dépendante du VSV. Une analyse plus précise a montré que L est la polymérase et P son cofacteur (De et Banerjee, 1985). Des résultats récents indiquent que l'activité de L est susceptible d'être régulée à travers sa participation à des complexes multiprotéiques distincts, impliquant les protéines N et P (Das *et al.*, 1997) ainsi qu'un facteur cellulaire souvent copurifié avec la protéine L (Das *et al.*, 1998). Selon le complexe auquel elle participe, la polymérase fonctionne comme une transcriptase ou une réplacase (**2.3.4**). Les autres activités de L sont spécifiques du complexe de transcription : il s'agit de la mise en place de la coiffe et sa méthylation, et de la polyadénylation des messagers (références citées dans : Le Mercier *et al.*, 1997). La grande taille de la protéine et la multiplicité des activités enzymatiques qu'elle possède en compliquent beaucoup l'étude. La plupart des informations ont été obtenues par des alignements multiples de séquences : la protéine L est relativement bien conservée parmi les protéines des Rhabdovirus et présente localement de l'homologie avec la L des Paramyxovirus (Le Mercier *et al.*, 1997).

La **phosphoprotéine P** (36 kDa) compte 297 résidus. Elle est produite abondamment par les cellules infectées, mais une partie seulement est incorporée dans les virions (**Fig. 5**). La séquence de P est la moins conservée au sein des Rhabdovirus.

La P du VR existe sous **plusieurs formes**, qui sont produites par deux mécanismes. Du fait de l'utilisation alternative de plusieurs codons initiateurs situés dans le même cadre de lecture. Le gène P du VR code ainsi quatre protéines de plus, qui sont autant de formes tronquées de P (Chenik *et al.*, 1995) (**Fig. 6**). La fonction de ces sous-produits est obscure ; il est néanmoins clair d'après la conservation de ces caractéristiques chez les Rhabdovirus et chez les Paramyxovirus, que le polymorphisme de P pourrait conférer un avantage sélectif à défaut d'être indispensable. Par exemple, la protéine C' des Vésiculovirus, qui est issue de la lecture du gène P dans un nouveau cadre de lecture, est capable d'accroître l'efficacité et la fidélité de la transcriptase dans des préparations de virions activés (Peluso *et al.*, 1996). La deuxième source de polymorphisme est post-traductionnelle : la P du VR sert de substrat à deux kinases qui ont été identifiées récemment (Gupta *et al.*, 2000). Des résultats obtenus avec la P du VSV montrent que la phosphorylation du domaine aminoterminal est susceptible de réguler sa structure oligomérique et d'activer la transcription (Gao et Lenard, 1995a, 1995b). Pour l'instant, le site d'oligomérisation et la structure oligomérique proposés diffèrent d'une étude à l'autre (Gao *et al.*, 1996 ; Gigant *et al.*, 2000 ; Raha *et al.*, 2000).

Fig. 6 : Représentation schématique de la protéine P. Le polymorphisme de P résulte de deux types de phénomènes : la phosphorylation des résidus S63, S64, S162, S210, S271 et l'utilisation de plusieurs codons initiateurs de la traduction (*leaky scanning*). Le site d'interaction de P avec la dynéine est compris entre les résidus 140 et 150 (Poisson *et al.*, 2001). Sites d'interaction avec les protéines L et N d'après Chenik *et al.* (1994, 1998).



P est le **cofacteur** de la polymérase. Des expériences réalisées avec le VSV ont montré que P est indispensable pour l'interaction de L avec la matrice N-ARN (Mellon et Emerson, 1978) et qu'elle potentialise la processivité de L (De et Banerjee, 1985).

La moitié aminoterminal est particulièrement riche en résidus acides. Ce caractère peut être accentué par suite de la phosphorylation de Ser₆₃ et Ser₆₄ par la RVPK, ce qui semble provoquer un changement de conformation (Gupta *et al.*, 2000). Les résidus S₁₆₂, S₂₁₀ et S₂₇₁ sont phosphorylés par des isomères de la PKC (Gupta *et al.*, 2000). Dans le cas du VSV, les sites de phosphorylation sont disposés de façon similaire et sont également distingués par deux enzymes différentes. L'équipe d'Amiya Banerjee a proposé que, sous sa forme phosphorylée la moitié aminoterminal pourrait activer la transcription (Takacs *et al.*, 1991 ; Pattnaik *et al.*, 1997). La phosphorylation des autres résidus pourrait être nécessaire pour la réplication tout en étant indifférente pour la transcription (Beckes et Perrault, 1992 ; Hwang *et al.*, 1999).

P possède des sites d'interaction avec les protéines virales N et L, et un crible double-hybride a révélé qu'elle interagit avec la chaîne légère de la dynéine, un moteur moléculaire (**Fig. 6**). Comme le soulignent ces multiples possibilités d'interaction et son polymorphisme, P est la sous-unité régulatrice de la polymérase : son rôle clef dans le choix entre réplication et transcription est établi chez le VSV, même s'il n'est pas encore compris (**2.3.4.**).

2.2.3. L'enveloppe virale

L'enveloppe qui entoure la nucléocapside est de nature protéolipidique : elle contient 50 % de lipides et 50 % de glycoprotéines (pour revue : Pal et Wagner, 1987). Si l'on excepte les protéines cellulaires qui sont incorporées en infime quantité (**2.2.4.**), deux protéines sont associées à l'enveloppe chez les Rhabdovirus : la glycoprotéine G et la protéine de matrice M.

La **membrane lipidique** est issue du système membranaire de la cellule hôte par bourgeonnement. La composition lipidique de la membrane du VR (souche Flury) a été déterminée et comparée à la celle de la membrane plasmique des cellules hôtes (Blough *et al.*, 1977). Les résultats montrent que la membrane du VR est enrichie en cholestérol par rapport à celle de la cellule hôte. La spécificité de la composition lipidique de l'enveloppe virale résulte vraisemblablement de deux phénomènes qui ont été documentés dans le cas du VSV : (1) le bourgeonnement pourrait avoir lieu à partir d'un sous-système membranaire déterminé (van Meer et Simons, 1982) et (2) l'incorporation des

lipides elle-même pourrait être sélective du fait d'interactions différenciées avec les protéines d'enveloppe (Luan *et al.*, 1995).

La **protéine de matrice M** (202 résidus ; 23 kDa) est une protéine aux fonctions diverses qui est impliquée à la fois dans l'assemblage et le bourgeonnement des virions ainsi que, chez le VSV, dans l'effet cytopathogène (Blondel *et al.*, 1990 ; Coulon *et al.*, 1990 ; Black *et al.*, 1993).

La localisation de la protéine M à l'intérieur du virion est controversée. Des travaux de pontage chimique réalisés sur des virions intacts ont montré que la M du VSV interagit avec la membrane virale tout en restant inaccessible aux réactifs les plus hydrophobes, ce qui a permis de classer M parmi les protéines d'enveloppe (pour revue : Pal et Wagner, 1987). Dans le modèle courant, M est donc située entre la nucléocapside et l'enveloppe (**Fig. 5**). Toutefois, Barge *et al.* (1993) ont proposé que la M du VSV serait à l'intérieur de la nucléocapside à la suite d'expériences d'immunomarquage en microscopie électronique.

L'interaction de la M du VSV avec les membranes a été confirmée *in vivo* par fractionnement cellulaire : Chong et Rose (1993) ont constaté que 10% des protéines M se localisent à la membrane dans des cellules HeLa transfectées. Dans le cas du VR, une fraction des protéines M présentes dans le virion est palmitoylée, ce qui est susceptible de stabiliser une interaction avec la membrane (Gaudin *et al.*, 1991a). L'interaction de la M du VSV avec les membranes a aussi été reconstituée *in vitro* avec des liposomes. Zakowski *et al.* (1981) ont montré que l'interaction est favorisée par des phospholipides chargés négativement, et qu'une composante non ionique, vraisemblablement hydrophobe, la complète après que le contact a été établi. Cela signifie que la liaison de M à la membrane a un effet sur sa structure ; cette observation n'est pas isolée puisque Scianimanico *et al.* (2000) ont montré que la structure quaternaire de la protéine de matrice du virus Ebola est réorganisée lorsqu'elle interagit avec la membrane.

La localisation sous-membranaire de M va de pair avec des propriétés qui en font un élément clef de l'**assemblage des virions**. Comme toutes les protéines de matrice virales, M est capable d'autoassemblage (Gaudin *et al.*, 1995a ; Gaudin *et al.*, 1997). Cette propriété joue un rôle majeur dans la morphogenèse des virions (Lyles *et al.*, 1996). Par ailleurs, les expériences de reconstitution *in vitro* de Newcomb et Brown (1981) ont montré que la M du VSV participe à l'assemblage des nucléocapsides à basse force ionique et maintient l'édifice sous une forme condensée semblable à ce

que l'on observe au sein des virions. L'interaction des nucléocapsides avec la sous-population membranaire de M d'une part (Chong et Rose, 1994) et la colocalisation de la M membranaire et de la G d'autre part (Lyles *et al.*, 1992 ; Luan *et al.*, 1995) a pour effet de rassembler l'ensemble des composants viraux, ce qui place de fait M au centre de l'assemblage des virions.

En plus de ses rôles structuraux, la M du VSV (229 résidus) est responsable de l'**effet cytopathogène** du virus (pour revue : Lyles, 2000). M inhibe efficacement la transcription cellulaire en l'absence de toute autre protéine virale et elle bloque les échanges nucléocytoplasmiques. von Kobbe *et al.* (2000) ont attribué ces deux activités à l'interaction de M avec un constituant du pore nucléaire, NuP 98. L'inhibition de la transcription de la cellule hôte serait un effet secondaire de l'activité de M au niveau du pore nucléaire.

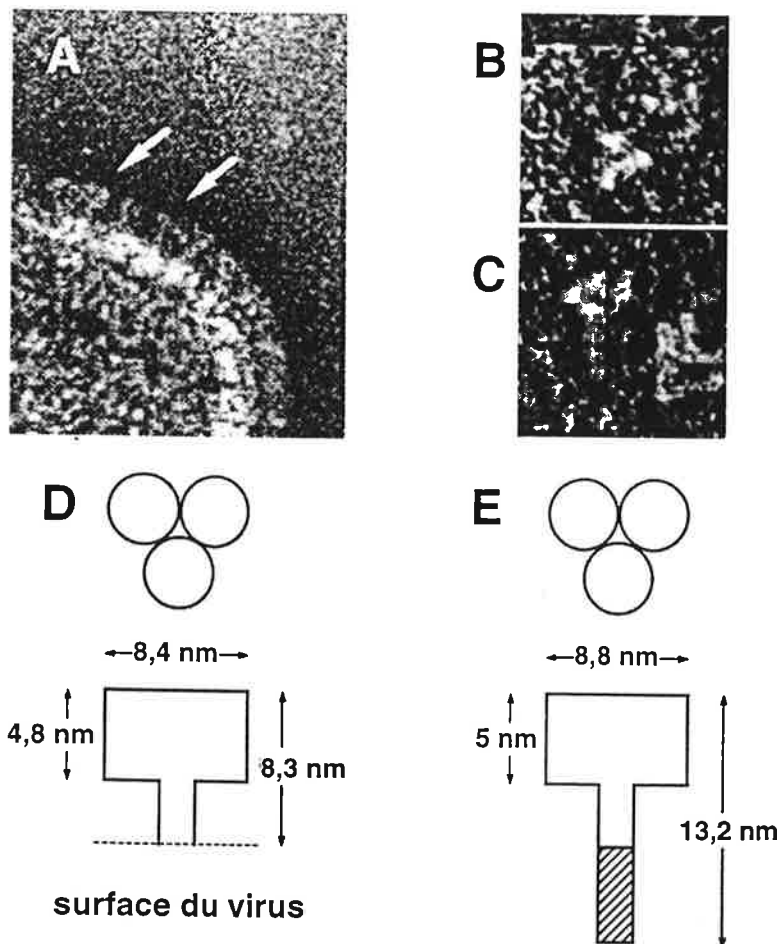
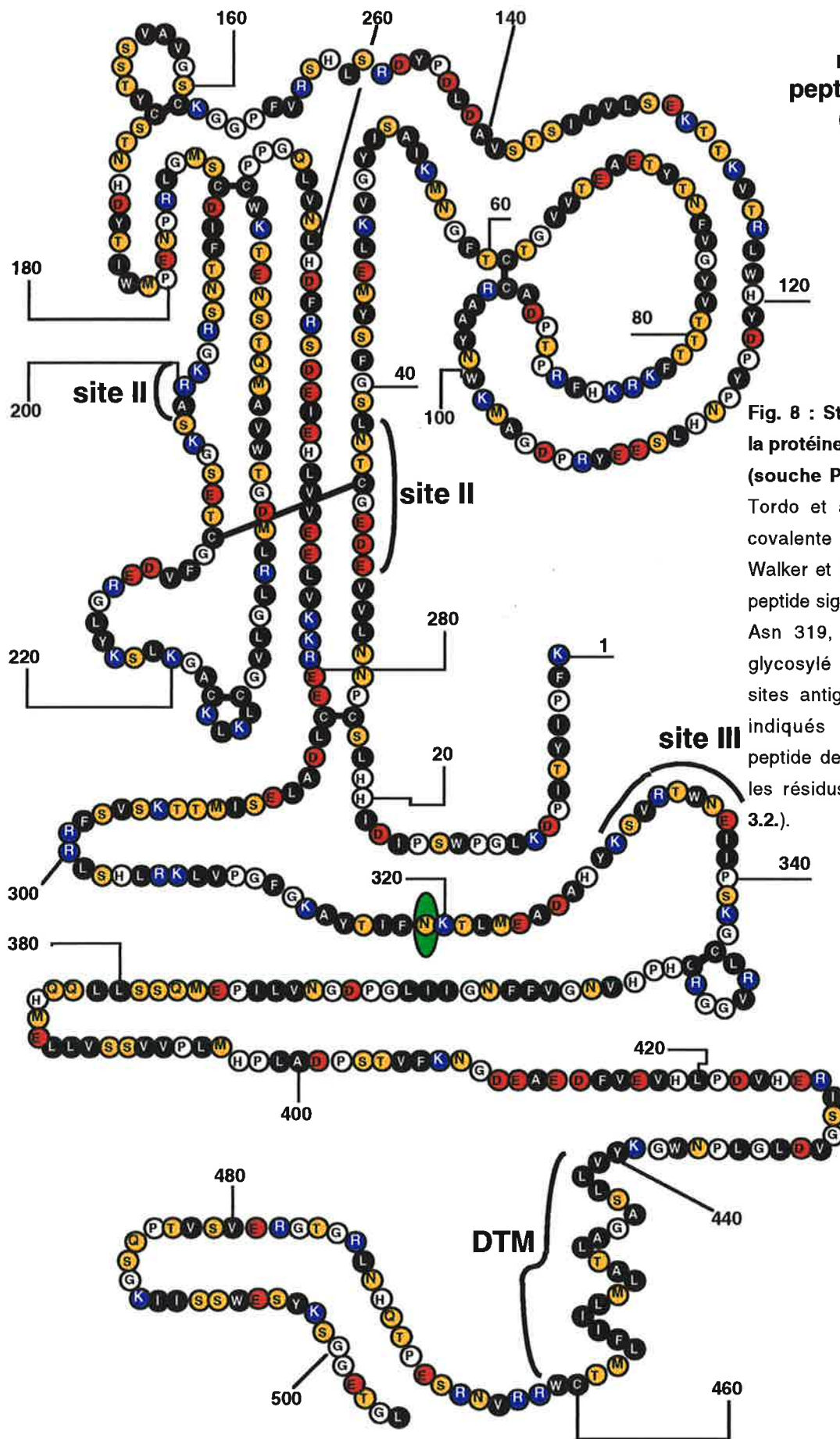


Fig. 7 : Morphologie de la protéine G (d'après Gaudin *et al.*, 1992). **A.** Surface d'un virion observée en microscopie électronique : chaque flèche désigne un spicule. Les spicules peuvent être observés individuellement en présence de 1 % de CHAPS. Vue de l'extrémité globulaire (**B.**) et vue du profil d'un spicule solubilisé (**C.**). L'analyse statistique des objets observés a permis de proposer un modèle pour les spicules solubilisés (**E.**) ou non (**D.**).



région du peptide de fusion (103-179)

Fig. 8 : Structure covalente de la protéine G du virus de la rage (souche PV). Séquence d'après Tordo et al. (1986b). Structure covalente d'après le modèle de Walker et Kongsuwan (1999). Le peptide signal est exclu. Le résidu Asn 319, auréolé en vert, est glycosylé (section 4.1.1.). Les sites antigéniques II et III sont indiqués (section 2.2.3.). Le peptide de fusion est situé entre les résidus 103 et 179 (section 3.2.).

La **glycoprotéine G** (62 kDa) forme des spicules trimériques qui recouvrent la surface du virion. La densité des spicules est telle qu'ils forment un liseré continu en bordure des particules virales (**Fig. 7**). Les données structurales sont rares : seule la structure covalente a été déterminée précisément (**Fig. 8**). G est longue de 505 résidus. C'est une protéine membranaire bitopique de type I. La morphologie des trimères a été déduite d'observations au microscope électronique (**Fig. 7**). Pour le reste, l'antigénicité de G est la propriété la plus couramment utilisée pour en caractériser la structure tertiaire (Gaudin *et al.*, 1993, 1997, 1999b).

G est la protéine rabique la plus étudiée. Il y a à cela des raisons fondamentales et des raisons médicales. En effet c'est elle qui reconnaît le(s) récepteur(s) à la surface des cellules cibles (**2.3.1.**), c'est elle qui assure la fusion des membranes virale et cellulaire (**2.3.2.**) et c'est contre elle que sont dirigés les anticorps neutralisants, qui sont la base de la protection vaccinale (**1.3.**).

Ces anticorps sont aussi un outil précieux : des collections importantes d'anticorps monoclonaux ont été constituées dans différents laboratoires ce qui a permis de caractériser l'antigénicité de G de façon approfondie. La G du VR a deux sites antigéniques majeurs appelés site II et site III, contre l'ensemble desquels 90% des anticorps sont dirigés. Le site II regroupe les résidus 34-42 et 198-200 (Préhaud *et al.*, 1988) et le site III comprend les résidus 330-338 (Seif *et al.*, 1985). Par ailleurs, des épitopes isolés et un site antigénique mineur a ont été définis. Les anticorps dirigés contre les sites II et III ne fonctionnent pas en Western-Blot ce qui indique que ces deux sites sont conformationnels ; c'est pour cette raison que les anticorps monoclonaux sont couramment utilisés comme sondes conformationnelles dans l'étude structurale de la G du VR.

En plus de son rôle clef dans l'attachement et la fusion, G participe au **bourgeonnement** des virions, qui est la dernière étape du cycle viral (**2.3.5.**). Ce rôle a d'abord été suspecté chez le VSV ; des expériences de complémentation d'un mutant thermosensible de la G ont permis de suggérer la participation du domaine cytoplasmique dans l'assemblage du virion (Metsikkö et Simons, 1986 ; Whitt *et al.*, 1989 ; Owens et Rose, 1993). Mettant à profit les progrès récemment accomplis dans les techniques de génétique inverse, Mebatsion *et al.* (1996) ont montré que G intervient dans le bourgeonnement du VR et qu'une partie de cette fonction est médiée par son domaine cytoplasmique. Pour ce faire, ils ont comparé l'efficacité du bourgeonnement de VR recombinants délétés du gène G ou codant une G dépourvue de domaine cytoplasmique avec celui du type sauvage. Le rôle du

domaine cytoplasmique a récemment été confirmé et attribué à son interaction avec M (Mebatsion *et al.*, 1999). Par ailleurs, Robison et Whitt (2000) ont montré que la région juxtamembranaire de l'ectodomaine de la G du VSV augmente elle-aussi l'efficacité du bourgeonnement. Ces résultats ont apporté une base moléculaire à la surprenante observation publiée par Rolls *et al.* (1994), qui avaient découvert qu'un réplicon exprimant la G du VSV comme unique protéine structurale était capable de se propager en culture de cellules. Rolls *et al.* (1994) avaient rapporté un comportement similaire mais 100 fois moins efficace pour la G du VR

G ayant fait l'objet des travaux présentés dans cette thèse, ses propriétés de fusion et la façon dont elle se replie dans le RE seront décrites plus en détail dans les sections 3. et 4..

2.2.4. Protéines cellulaires présentes dans le virion

L'assemblage des virions implique les protéines de structure du virus. Toutefois, on y trouve fréquemment des protéines cellulaires : il s'agit notamment de protéines du cytosquelette (actine et protéines liant l'actine) mais aussi de kinases, de chaperons, qui sont parfois nécessaires à l'infectiosité des virions.

Dans le cas du VR, des protéines du cytosquelette (Sagara *et al.*, 1995), des kinases cellulaires (Gupta *et al.*, 2000), ainsi qu'une protéine transmembranaire jusque-là inconnue (Sagara *et al.*, 1997) ont été détectées dans les virions. Il est probable que l'identification de nouveaux partenaires cellulaires pour les protéines virales (Das *et al.*, 1998 ; Harty *et al.*, 1999 ; Jacob *et al.*, 2000 ; Raux *et al.*, 2000) permettra de compléter cette liste.

La signification de la présence de protéines cellulaires reste le plus souvent à préciser. Il est vraisemblable que les protéines incorporées dans les virions interagissent, directement ou non, avec des composants d'origine virale eux-mêmes incorporés dans les virions, mais des expériences de coexpression montrent que l'incorporation de protéines membranaires pourrait être passive (Schnell *et al.*, 1996).

2.3 Le cycle viral

Le spectre d'hôtes du VR s'étend à tous les mammifères, chez lesquels il est strictement neurotrope. Il a toutefois été adapté à de nombreux types de cellules en culture. Comme tous les virus,

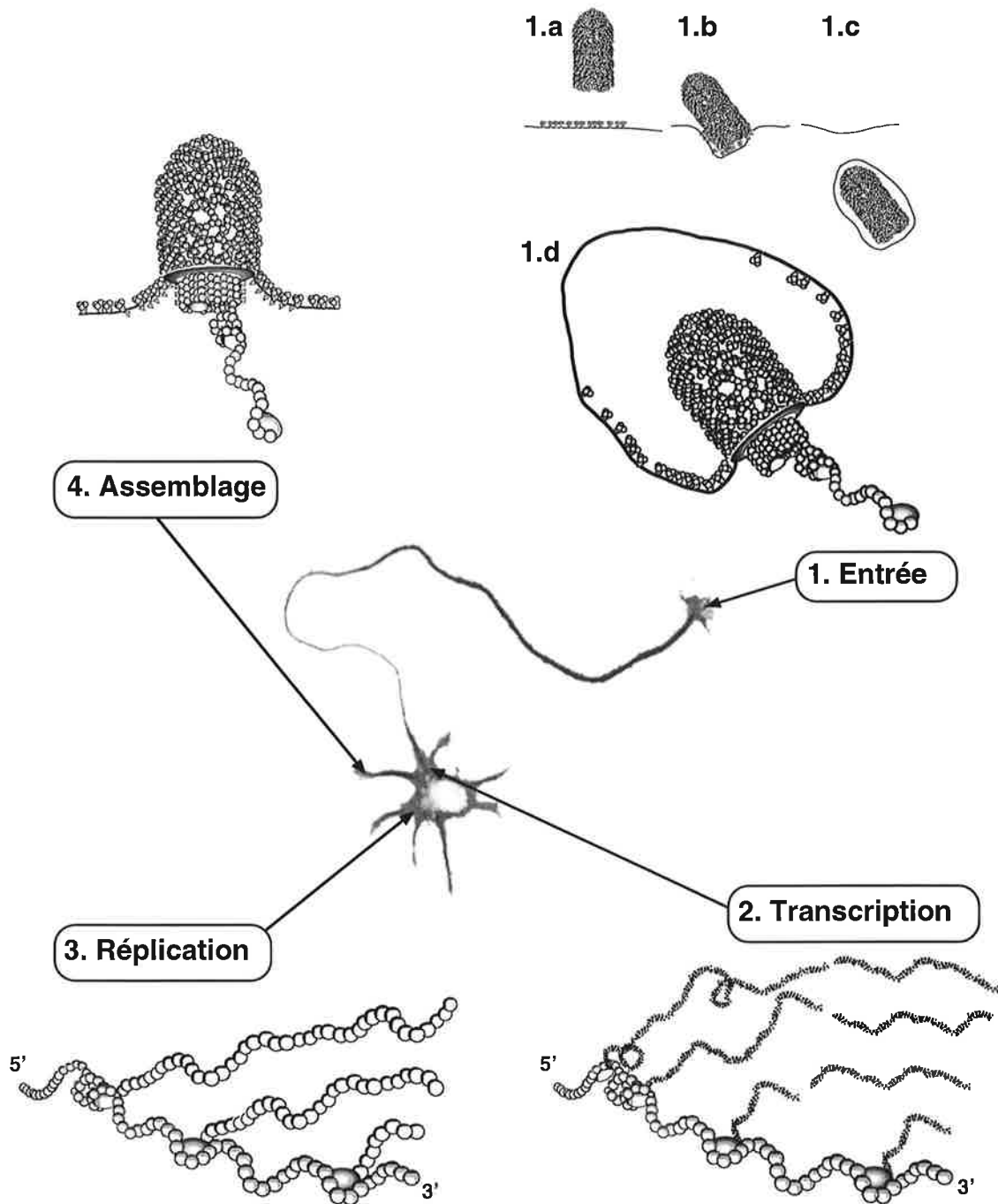


Fig. 9 : Schéma du cycle du virus de la rage dans un neurone. La reconnaissance d'une cellule cible par un virion est assurée par l'interaction de la protéine G avec un récepteur cellulaire (1.a, b). Cette interaction est suivie par l'endocytose du virus (1.b, c). L'acidification de la vésicule d'endocytose déclenche la fusion des membranes virale et cellulaire, ce qui entraîne le relargage de la capsidie dans le cytoplasme (1.d). Le génome est transcrit en ARN messagers par le complexe de transcription apporté par le virion (2.) puis répliqué par un complexe de réplication (3.). Synthèse et encapsidation des génomes sont simultanées (3.). Les constituants viraux sont rassemblés aux sites de bourgeonnement (4.). G est responsable de l'entrée du virus ; la nucléocapside (ARN+N+P+L) assure la transcription et la répllication du génome ; l'assemblage fait intervenir toutes ces protéines plus M dont c'est le rôle principal.

le VR est un parasite cellulaire obligatoire : inerte avant d'être reconnu par une cellule cible, c'est en parfait opportuniste qu'il détourne alors les différentes ressources qu'elle possède (**Fig. 9**). A l'instar du VSV pour lequel de nombreuses données sont disponibles, il utilise la voie d'endocytose pour entrer dans la cellule (Matlin *et al.*, 1982) puis il profite des machineries de biosynthèse (traduction, repliement) et des ressources énergétiques entretenues par la cellule (Conti *et al.*, 1990). La survie du virus dépend notamment de l'efficacité avec laquelle il interagit avec les différents métabolisme de la cellule, spécialement en matière d'expression et de routage intracellulaire (Sleat *et al.*, 1992 ; Müsch *et al.*, 1996).

2.3.1 Liaison du virus à la cellule cible

Seul élément de surface du virion, G est responsable de la reconnaissance des récepteurs sur les cellules cibles. A ce titre, elle contribue au tropisme du VR (pour revue : Flamand *et al.*, 1998).

Les travaux de Superti *et al.* ont montré que des cellules traitées à la neuraminidase étaient significativement résistantes à l'infection par le VR jusqu'à 6 heures après le traitement enzymatique et que l'incubation des cellules avec des gangliosides pendant cette phase de résistance rétablissait l'infectiosité (Superti *et al.*, 1986). L'équipe de Henri Tsiang proposa que des gangliosides fassent partie du récepteur. Ce type de molécule étant universellement répandu, cela permettait d'expliquer le très large spectre d'hôtes du virus de la rage *ex vivo*.

Le premier récepteur protéique a été suggéré sur la base d'une certaine homologie entre la région 189-214 de G et des neurotoxines de serpents antagonistes de l'acétylcholine (Lentz *et al.*, 1984). Gastka *et al.* (1996) ont vérifié par *overlay* que le VR est capable de se lier à la sous-unité α du récepteur de l'acétylcholine. Comme ce récepteur est principalement localisé à la jonction neuromusculaire, il pourrait jouer un rôle dans la pénétration du virus dans le système nerveux périphérique depuis le site d'inoculation (1.2.). Reagan et Wunner (1985) ont montré que la susceptibilité de diverses lignées cellulaires au VR ne dépend pas de la présence du récepteur à l'acétylcholine à leur surface, donc que d'autres molécules servent de récepteurs au VR.

Deux autres protéines ont récemment été identifiées comme récepteurs du VR. Thoulouze *et al.* (1998) ont essentiellement procédé de façon déductive avant de montrer que la molécule d'adhésion des cellules nerveuses (*N-CAM*) est capable de médier l'entrée du virus tandis que Tuffereau *et al.* (1998) ont identifié le récepteur de basse affinité au facteur de croissance des cellules

nerveuses (p75) comme ligand de G en criblant une banque de cellules neuronales. Dans ce dernier cas, la présence de résidus basiques aux positions 330 et 333 a été trouvée critique pour l'interaction entre G et p75, conformément aux données acquises sur la neurovirulence (1.2.).

La complexité de l'interaction du virus avec les différents tissus de l'organisme hôte avait déjà été discutée dans les travaux de Kucera *et al.* (1985), Coulon *et al.* (1989) et Lafay *et al.* (1991) qui ont suggéré que plusieurs catégories de récepteurs existent à la surface des cellules nerveuses. L'existence de plusieurs récepteurs de nature différente pour un virus est un fait courant (pour revue : Baranowski *et al.*, 2001), et la diversité des molécules pouvant jouer ce rôle est reconnue (pour revue : Gerlier, 1998).

2.3.2 Pénétration du virus dans une cellule cible

Une fois lié aux molécules du récepteur, le VR est internalisé par endocytose. A ce stade, le génome viral est encore séparé du cytoplasme par la membrane du virion et celle de la cellule. L'acidification du contenu de l'endosome déclenche des réarrangements structuraux dans G dont certaines, réunies dans un complexe de fusion, vont arrimer les membranes l'une à l'autre, les rapprocher, les déstabiliser localement et provoquer leur fusion (pour revue : Gaudin *et al.*, 1999c). Nous reviendrons sur ces événements dans la section 3.2.

Les événements consécutifs à la fusion membranaire ont été étudiés par visualisation directe et fractionnement cellulaire dans le cas d'une infection par le VSV (Rigaut *et al.*, 1991). La protéine M diffuse dans le cytoplasme tandis que les nucléocapsides restent assemblées, quoique sous une forme relâchée. D'après les mêmes auteurs, la G reste confinée dans des compartiments de la voie d'endocytose. Enfin, lors de l'infection d'une extrémité neuronale par le VR, la nucléocapside doit gagner le corps cellulaire qui est le siège des synthèses du neurone. Ceci nécessite d'emprunter la voie rétrograde et l'interaction entre P et la chaîne légère de la dynéine, moteur à tropisme centripète, pourrait en être responsable (Jacob *et al.*, 2000 ; Raux *et al.*, 2000).

2.3.3 Transcription du génome et traduction

L'ARN génomique étant complémentaire des ARN messagers, il n'est pas infectieux par lui-même : c'est la **ribonucléocapside** qui est infectieuse (Thornton *et al.*, 1983). La découverte de la présence de la polymérase à l'intérieur des virions revient à Baltimore *et al.* (1970) qui ont montré

qu'une préparation du VSV traité par un détergent non ionique et à forte concentration saline permettait la synthèse des ARN viraux en présence de ribonucléotides. Ce traitement mime les effets de la décapsidation en solubilisant la membrane virale ainsi que les protéines qui lui sont associées (Emerson et Wagner, 1972), en particulier la protéine M qui est capable d'inhiber la transcription virale à faible force ionique (De *et al.*, 1982). Plus tard, la polymérase a aussi été détectée dans les virions rabiques (Flamand *et al.*, 1978).

Les synthèses virales débutent par la transcription d'un ARN non codant long de 47 nucléotides complémentaires à l'extrémité 3' du génome, le *leader*, et de cinq ARN messagers monocistroniques (Fig. 4, 10) (pour revue : Conzelmann, 1998). L'ARN leader a une extrémité 5' triphosphate et n'est pas polyadénylé. En revanche la structure des ARNm viraux est indiscernable de celle de leurs équivalents cellulaires : ils sont coiffés et polyadénylés dans le cytoplasme par la protéine L, ce qui leur donne directement accès à la machinerie de traduction de la cellule hôte.

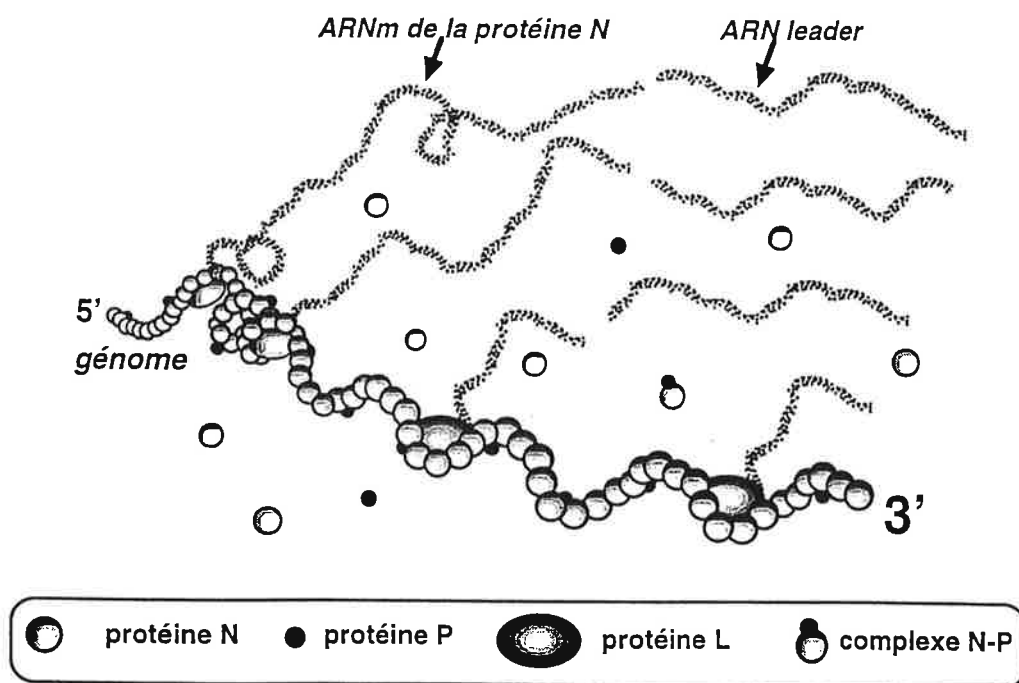


Fig. 10 : Schéma de la transcription des Rhabdovirus. Le complexe de transcription progresse à partir d'un seul point d'entrée, à l'extrémité 3' du génome (Emerson, 1982). 6 ARN sont produits séquentiellement et en quantité décroissante, l'efficacité de la réinitiation étant inférieure à 100 %. Le gène N est abondamment transcrit tandis que l'ARNm du gène L n'est produit qu'en faible quantité. Ici, l'abondance relative des protéines est déterminée par l'ordre des gènes.

Des études cinétiques ont révélé que la transcription est **séquentielle** : l'apparition du leader précède en effet celle des autres transcrits, dans l'ordre où se trouvent les cinq gènes le long du génome (Ball et White, 1976). Par ailleurs, les différents ARN viraux sont produits en quantité décroissante depuis l'extrémité 3' du génome (Iverson et Rose, 1981) : la transcription est donc polarisée.

Pour expliquer l'ensemble de ces observations, le modèle de la **réinitiation** (ou *stop-start*) est considéré comme le plus probable (pour revue : Conzelmann, 1998). Dans ce modèle, la transcriptase dispose d'un seul site d'entrée, à l'extrémité 3' de la nucléocapside. Parvenue au signal de terminaison d'un gène, la transcriptase synthétiserait la queue polyA en lisant de façon répétée la séquence U₇ présente dans le signal. Après avoir libéré l'ARNm polyadénylé, elle continuerait sa progression le long de la matrice pour reprendre la transcription au niveau du signal de réinitiation consécutif. Compte tenu de l'atténuation décrite par Iverson et Rose (1981), le modèle prévoit que l'efficacité de la réinitiation après chaque pause est de 70-80% dans le cas du VSV. L'influence de la séquence intergénique sur l'efficacité de la réinitiation a depuis été démontrée, par génétique inverse, chez le VSV et chez le VR (Stillman et Whitt, 1998 ; Finke *et al.*, 2000).

2.3.4 Réplication

La réplication est cytoplasmique, comme chez la plupart des virus à ARN. Réplication et transcription sont toutes les deux initiées à l'extrémité 3' du génome (**Fig. 11**) mais elles diffèrent par le caractère continu de la progression du complexe de réplication, qui ignore les signaux de transcription et produit une molécule de même longueur que le génome : l'**antigénome**. Les cellules infectées par le VR accumulent 50 fois plus de génomes que d'antigénomes (Finke et Conzelmann, 1997). La superposition des signaux de réplication et de transcription à l'extrémité 3' du génome pourrait expliquer ce phénomène en causant une compétition entre les complexes de transcription et de réplication (Whelan et Wertz, 1999a).

La fréquence des erreurs faites par la répliqueuse a été estimée à 10^{-4} (Steinhauer et Holland, 1986 ; Benmansour *et al.*, 1992 ; Kissi *et al.*, 1999) ce qui, compte tenu de la taille du génome, introduit rapidement une grande diversité dans les populations virales. La notion de quasi-espèce a été créée pour décrire ce type de situation (pour revue : Eigen, 1996). L'accumulation d'erreurs dans un génome de 12kb pourrait compromettre la viabilité du virus. De fait, Clarke *et al.* (1993) ont montré que

le passage en série de petites populations (d'un petit nombre de quasi-espèces) entraîne assez fréquemment des problèmes de *fitness*, d'aptitude à la survie ; ces problèmes n'apparaissent pas dans les populations plus larges où les quasi-espèces les mieux adaptées sont toujours présentes et sélectionnées.

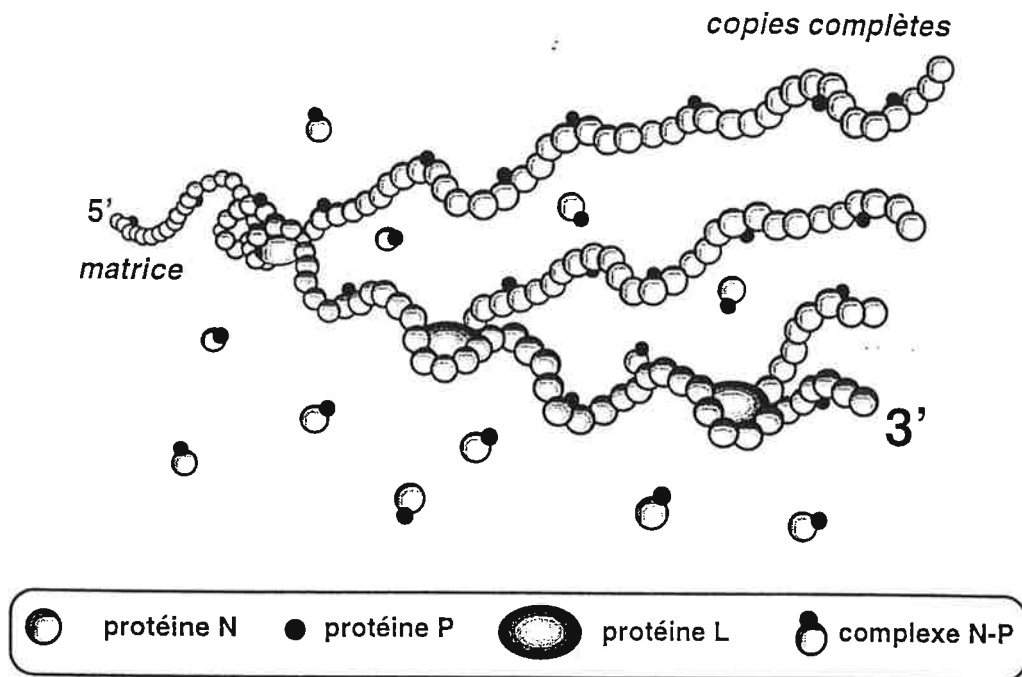


Fig. 11 : Schéma de la réplication des Rhabdovirus. Lorsque le contexte est favorable à la réplication, la polymérase produit des copies complètes de la matrice : génome ou antigénome. L'activité de la polymérase est régulée par la composition du complexe auquel elle participe et par la structure de la capsidie à la jonction *leader-N*.

Les génomes et les antigénomes produits par la réplicase ne sont fonctionnels qu'une fois encapsidés, c'est pourquoi la synthèse continue des protéines N et P est nécessaire à la réplication (pour revue : Conzelmann, 1998). L'encapsidation commence au niveau du leader (extrémité 5') de chacun des deux brins. Ces deux observations ont conduit à l'élaboration d'un modèle où le choix du mode de progression (continu ou discontinu) serait dicté au moins en partie par la structure de la capsidie au niveau de la jonction leader-gène N (Blumberg *et al.*, 1981). Dans ce modèle, **l'encapsidation du leader** en cours de synthèse pourrait masquer le signal de terminaison du leader et favoriser la lecture continue du génome.

La régulation de la réplication est aussi contrôlée par des interactions entre protéines (Chuang *et al.*, 1997 ; Das *et al.*, 1997 ; Gupta et Banerjee, 1997). Par exemple, une interaction entre les

produits des gènes L et N pourrait réguler l'antiterminaison au niveau de la jonction leader-N, donc le choix entre transcription et réplication (Chuang *et al.*, 1997). Par ailleurs, Peluso et Moyer (1988) ont montré que la disponibilité de la N du VSV pour l'encapsidation est régulée par la protéine P. P maintient la protéine N sous une forme soluble et compétente pour la réplication, tandis que N s'agrège et devient inapte à la réplication en son absence (Howard et Wertz, 1989) (**Fig. 11**). Enfin, la phosphorylation du domaine aminoterminal de P modifie sa structure et active la transcription : cette modification post-traductionnelle régule donc probablement l'assemblage des complexes de transcription et de réplication (2.2.2.).

2.3.5 Assemblage et bourgeonnement

L'assemblage des virions est un processus concerté dont la protéine M du VR régule toutes les étapes (2.2.1.) en interagissant à la fois avec la membrane, les ribonucléocapsides et le domaine cytoplasmique de la protéine G (Mebatsion *et al.*, 1999 ; Nakahara *et al.*, 1999).

La M et la G du VSV se localisent préférentiellement à la membrane basolatérale des cellules MDCK (Gottlieb *et al.*, 1986 ; Bergmann et Fusco, 1988). Chez le VR, le choix du site d'assemblage pourrait être influencé par la palmitoylation d'une partie des protéines M et G (Gaudin *et al.*, 1991a). Cette modification est en effet susceptible de moduler la localisation subcellulaire de ces deux protéines en les partitionnant dans des domaines membranaires particuliers : les microdomaines enrichis en cholestérol ou *rafts* (pour revue : Simons et Ikonen, 1997). Or dans les cellules à forte polarité fonctionnelle comme les neurones, les différents domaines fonctionnels (axone et dendrites dans ce cas) ont une composition lipidique caractéristique : Ledesma *et al.* (1998) ont montré que les *rafts* sont spécifiques des axones. La transmission transsynaptique (1.2.) impliquant un bourgeonnement localisé, le choix du site d'assemblage pourrait aussi être déterminé par l'interaction des protéines d'enveloppe avec des protéines cellulaires spécifiques des synapses.

Au-delà de l'assemblage des virions, M joue un rôle déterminant dans le bourgeonnement lui-même. Li *et al.* (1993) ont montré que la M du VSV, une fois localisée à la membrane, suffit à provoquer son évagination et est finalement libérée dans des vésicules. Cette fonction est médiée par le recrutement de facteurs cellulaires, *via* un court motif riche en prolines qui est aussi présent dans la protéine de matrice des Filovirus et des Rétrovirus (Harty *et al.*, 1999 ; Jayakar *et al.*, 2000).

3. Protéine G du virus rabique et fusion membranaire

La glycoprotéine et ses fonctions ont déjà été décrites dans la section 2.2.3. Nous allons présenter ici son activité fusogène, dont la caractérisation a débuté avec les années 1980. White *et al.* (1981) ont constaté que des cellules infectées par le VSV fusionnaient entre elles après incubation à pH acide. Metsikkö *et al.* (1986) ont reconstitué les propriétés fusogènes du VSV dans des protéoliposomes contenant la G pour seule protéine. La connaissance des propriétés de cette dernière et des caractéristiques de la fusion membranaire a beaucoup progressé par suite du développement de nouveaux protocoles de fusion.

3.1. Caractéristiques de la fusion médiée par G

Pour le VR comme pour d'autres virus, un test de fusion entre le virus et des liposomes de composition définie a permis de caractériser un certain nombre de facteurs et d'événements clefs de la fusion membranaire (Gaudin *et al.*, 1991b, 1993, 1995b, 1996, 2000).

C'est l'acidification de l'endosome qui déclenche la pénétration du VR dans sa cellule cible (2.3.2). La dépendance de la fusion vis-à-vis du pH a été caractérisée par Gaudin *et al.* (1991b, 1993, 1995b). Elle est optimale aux alentours de pH 6 et est détectée jusqu'à un pH de 6,3. Des valeurs proches ont été constatées avec les autres rhabdovirus. Il est intéressant de constater que des mutants du VSV et du VHSV dont le pH seuil de fusion est altéré, se distinguent par une virulence accrue ou atténuée, selon que le pH seuil est respectivement élevé ou abaissé (Frederiksen et Whitt, 1996, 1998 ; Gaudin *et al.*, 1999a). Dans le cas de l'infection de cellules neuronales, Morimoto *et al.* (1992) ont montré que la fusion membranaire pourrait être indépendante du pH.

Le développement d'un test de fusion du VR avec des liposomes a permis à Gaudin *et al.* (1991b) d'observer que la **composition lipidique** des liposomes n'est ni déterminante ni totalement indifférente. Par ailleurs, deux équipes ont spécifiquement étudié l'effet de la composition des membranes sur la fusion induite par le VSV. Yamada et Ohnishi (1986) ont montré avec des liposomes, que la fusion médiée par le VSV ne requiert pas de phospholipide particulier mais nécessite qu'un nombre suffisant de chaînes aliphatiques soient insaturées. Ce résultat a été confirmé

par Herrmann *et al.* (1990) avec des membranes naturelles modifiées. Il n'est toutefois pas clair si l'effet de l'insaturation doit être envisagé en termes de morphologie des lipides (Yamada et Ohnishi, 1986) ou de fluidité membranaire (Herrmann *et al.*, 1990).

Sauf conditions particulières, lors des expériences de fusion du VR avec des liposomes, un certain **délai** précède l'accomplissement de la fusion (Gaudin *et al.* 1991b, 1993, 1995b). La durée de ce délai diminue avec la température et augmente avec le pH. Il en va de même chez le VSV pour lequel il a été observé même après que le virus a été préincubé avec les cellules cibles (Clague *et al.*, 1990), ce qui prouve que ce délai n'est pas lié à une étape d'adsorption. L'analyse de la fusion du VR dans des conditions suboptimales a permis de montrer qu'il est possible de raccourcir ce temps de latence en modifiant la composition lipidique de la membrane (Gaudin, 2000). Ce délai s'explique donc par des réarrangements lipidiques (3.2.2.).

Enfin, la préincubation du VR à pH acide en l'absence de membrane cible inactive ses propriétés de fusion (Gaudin *et al.*, 1991b). L'**inactivation** est d'autant plus rapide que le pH est bas et que la température est élevée. Cette inactivation est commune à tous les virus fusionnant à bas pH (Rhabdovirus, Filovirus, Orthomyxovirus, Flavivirus, Alphavirus) cependant le VR et les Rhabdovirus en général se distinguent des autres virus de cette catégorie parce que la neutralisation du milieu leur permet de récupérer leur pouvoir fusogène (Gaudin *et al.*, 1991b). L'inactivation est irréversible dans le cas des autres familles virales.

3.2. Bases structurales de la fusion médiée par G

3.2.1. L'ectodomaine de G peut adopter plusieurs conformations

La G du VR existe sous plusieurs conformations aux propriétés distinctes. Trois conformations en équilibre ont été identifiées : la forme native (N), la forme activée (A) et la forme inactive (I) (**Fig. 12**). L'équilibre entre N, A et I dépend du pH : 50% des spicules virales sont dans la forme I à pH 6,7 (Gaudin *et al.*, 1993).

La G des virions matures est sous la forme **N**, majoritaire à pH neutre. C'est donc N qui reconnaît les récepteurs cellulaires. La forme **A** est responsable de l'agrégation des virions à pH acide et basse température (Gaudin *et al.*, 1993). A ressemble à N par son antigénicité mais s'en distingue

par l'exposition du **peptide de fusion** qui confère à A un caractère hydrophobe. Le peptide de fusion est responsable des premières étapes de la fusion à température permissive et de l'agrégation des virions à basse température (3.2.2.). Des expériences de marquage à l'aide d'un analogue radioactif de phosphatidylcholine photoactivable ont permis de le localiser entre les résidus 103 et 179 (Fig. 8) après clivage au CNBr (Durrer *et al.*, 1995).

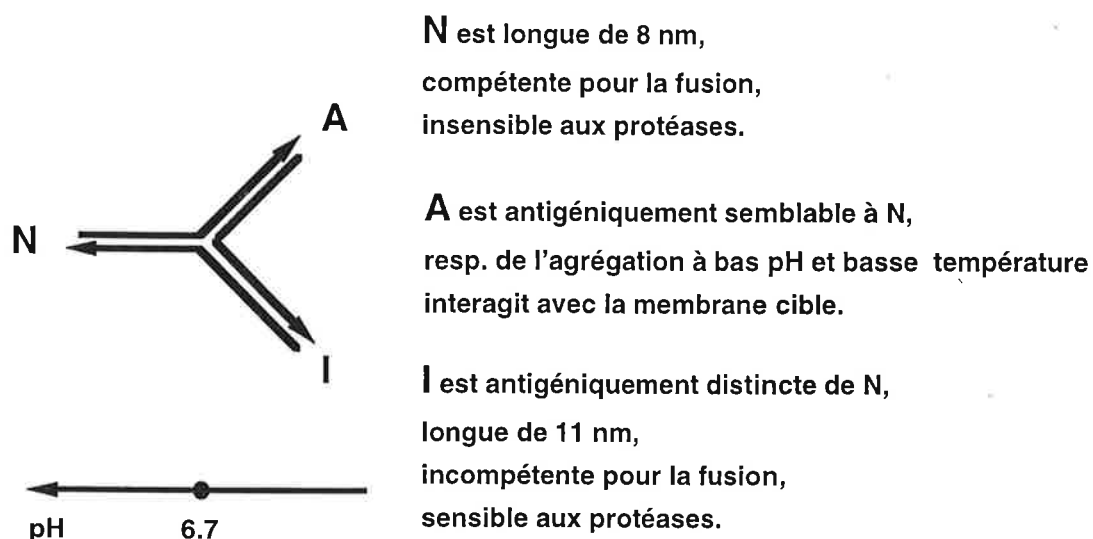


Fig. 12 : La protéine G existe sous plusieurs conformations en équilibre. (Gaudin *et al.*, 1991b, 1992, 1993).

Après des incubations prolongées à pH acide, c'est la forme I qui est détectée en l'absence de membrane cible (Gaudin *et al.*, 1993). Le changement de conformation est visible sur les clichés de microscopie électronique où I se distingue de N par sa forme plus allongée. I se caractérise aussi par l'absence des sites antigéniques conformationnels II et III et sa sensibilité aux protéases (Gaudin *et al.*, 1993, 1995b).

Dans le cas du VR, les pH seuil de la fusion et de l'inactivation sont différents : 6,3 pour la fusion et 6,7 pour l'inactivation (Gaudin *et al.*, 1993). D'autre part la caractérisation de mutants dont le changement de conformation de N vers I est ralenti, a montré que la cinétique d'inactivation peut être fortement ralentie sans modification des propriétés de fusion (Gaudin *et al.*, 1996). C'est pourquoi le changement de conformation vers I a été présenté comme étranger à la fusion proprement dite. A la suite d'une étude par immunofluorescence, Gaudin *et al.* (1995b) ont montré que G transite à travers l'appareil de Golgi sous une forme antigéniquement semblable à I. Telle serait alors la fonction de la forme I : G transiterait dans les compartiments acides sous la forme I, non fusogène, puis retrouverait sa forme N à la surface de la cellule, N et I étant en équilibre (Gaudin *et al.*, 1991b).

Chaque conformation a donc des propriétés spécifiques. Il faut souligner que l'activité fusogène ne peut pas être attribuée à une conformation particulière : **la fusion accompagne les changements de conformation** des protéines fusogènes. Le changement de conformation de la G étant réversible, elle réadopte la conformation N après neutralisation du pH et est à nouveau susceptible de subir les changements de conformation qui conduisent à la fusion membranaire. C'est pourquoi l'inactivation des propriétés de fusion des Rhabdovirus est réversible (3.3.). Par contre, dans le cas du virus de la grippe et des autres virus dont l'entrée dépend du pH, l'inactivation des propriétés de fusion du virus à pH acide est irréversible, comme le changement de conformation de leur glycoprotéine fusogène (Stegmann *et al.*, 1986 ; Wharton *et al.*, 1986 ; Bron *et al.*, 1993).

Des VR mutants affectés dans le changement de conformation de N vers I ont été sélectionnés à l'aide d'anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement la forme I à la surface des virions (Raux *et al.*, 1995). A cause du protocole de sélection, ces mutants ont été appelés RAIN pour *resistant to acid-induced neutralization*. Une fois écartés les mutants affectés dans les épitopes contre-sélectionnés, ces travaux ont permis d'identifier au moins une région impliquée dans la régulation du changement de conformation de G (Gaudin *et al.*, 1996). En effet deux des quatre positions associées au phénotype RAIN, Val₃₉₂→Gly et Met₃₉₆→Thr, sont localisées dans la partie carboxyterminale de l'ectodomaine, au voisinage d'éléments de séquence conservés chez l'ensemble des Rhabdovirus. Il a donc été proposé que cette région intervienne dans la régulation de la transition conformationnelle N ↔ I.

Les propriétés structurales et fonctionnelles de G sont aussi étudiées chez d'autres rhabdovirus que le VR. Dans le cas du VSV, un modèle où G existerait sous trois conformations en équilibre a aussi été proposé. Il est intéressant de constater que ce modèle est issu de l'analyse cinétique de la fusion virale (Puri *et al.*, 1988 ; Clague *et al.*, 1990) et non d'une étude biochimique comme ce fut le cas pour le VR (Gaudin *et al.*, 1993). La plupart des données biochimiques concernant ces trois états ont été collectées plus tard (Pak *et al.*, 1997 ; Carneiro *et al.*, 2001), bien que l'effet du pH sur la conformation de G aït d'abord été mis en évidence sur un fragment soluble produit par l'action de la cathepsine D sur les virions du VSV (Crimmins *et al.*, 1983).

Les travaux de mutagenèse dirigée de l'équipe de Hara Ghosh, ainsi que celle de Michael Whitt, ont contribué à mettre en évidence le rôle du peptide de fusion et de la région carboxyterminale de l'ectodomaine dans la régulation des changements de conformation de la G du VSV (Li *et al.*,

1993a ; Shokralla *et al.*, 1998). Ces régions correspondent respectivement au peptide de fusion et à une région régulatrice des changements de conformation de la G du VR (Durrer *et al.*, 1995 ; Gaudin *et al.*, 1996). Ces deux régions ont été également impliquées dans la virulence du VHSV à la suite de la sélection de mutants résistant à des anticorps neutralisants (Gaudin *et al.*, 1999a). La mutation simultanée de ces deux régions a un impact additif sur la fusion médiée par la G du VSV (Shokralla *et al.*, 1999) ou sur la virulence d'un rhabdovirus infectant les poissons, le Virus de la Septicémie Hémorragique Virale (VHSV) (Gaudin *et al.*, 1999a). Chez le VHSV, la réversion systématique des deux mutations et non d'une seule dans les double mutants indique que ces régions pourraient interagir dans la structure tertiaire de la protéine (Gaudin *et al.*, 1999a).

3.2.2. La fusion membranaire est un processus multi-étape

En dépit de nombreux travaux menés principalement sur le virus de la grippe, les mécanismes moléculaires conduisant à la fusion membranaire sont encore mal connus. Beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'étude structurale des protéines fusogènes (pour revue : Weissenhorn *et al.*, 1999) et c'est plus récemment que les lipides membranaires ont trouvé leur place dans des modèles cohérents (pour revue : Chernomordik *et al.*, 1999).

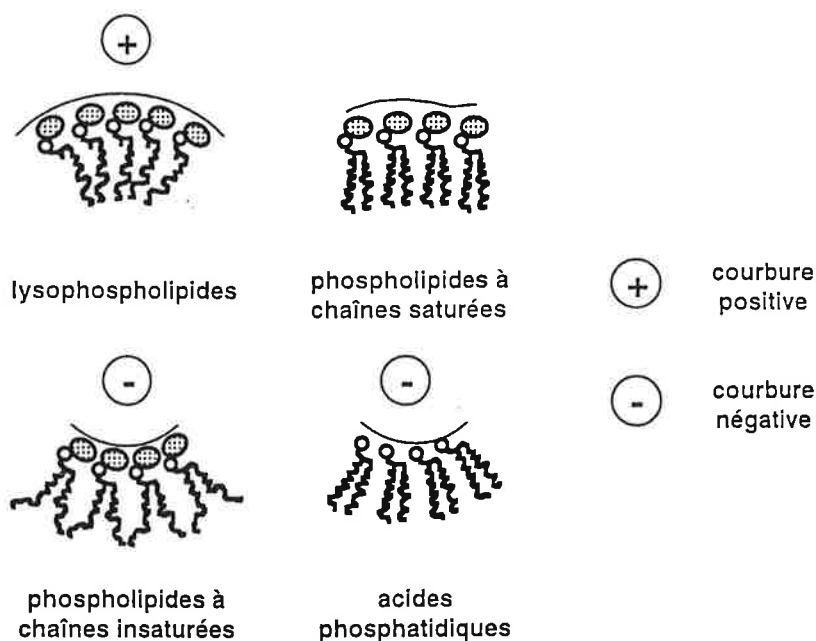


Fig. 13 : Forme des lipides et rayon de courbure. Les lysophospholipides favorisent une courbure positive. Les acides phosphatidiques et les phospholipides aux acides gras insaturés favorisent une courbure négative.

Les résultats obtenus avec des systèmes modèles (Lee et Lentz, 1998) et des systèmes viraux (Chernomordik *et al.*, 1997, 1998 ; Gaudin, 2000) suggèrent que les intermédiaires membranaires conduisant à la fusion sont identiques d'un système à l'autre. En effet, la modification la **courbure** de

la monocouche *via* l'incorporation de lipides de forme particulière dans l'une des monocouches, a eu des effets identiques dans tous les systèmes étudiés à ce jour (**Fig. 13**). Selon la monocouche dans laquelle ils sont incorporés, les lysophosphatidylcholines (qui favorisent les courbures négatives) et l'acide oléïque (qui favorise les courbures positives) peuvent bloquer la fusion ou bien la favoriser (pour revue : Chernomordik *et al.*, 1999). Ces résultats ont permis de proposer un modèle universel pour la fusion de deux membranes (**Fig. 14**).

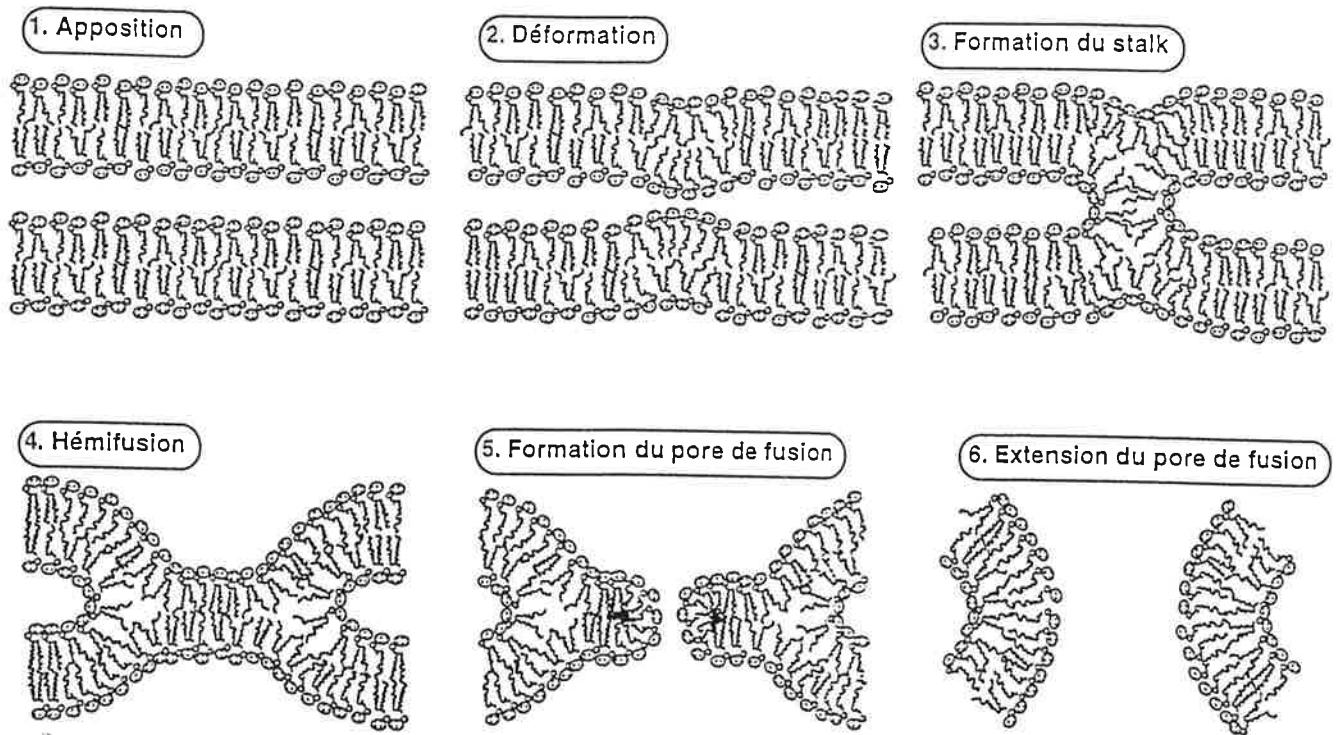


Fig. 14 : Fusion membranaire. Intermédiaires réactionnels lors de la fusion de deux bicouches lipidiques. 1. Rapprochement des deux membranes. 2 et 3. Fusion des feuillettes externes : la structure du stalk implique une courbure négative. 4. Formation du diaphragme d'hémifusion. 5 et 6. L'apparition du pore dans le diaphragme d'hémifusion implique une courbure positive.

Le rapprochement des deux membranes doit d'abord surmonter une force répulsive due à l'hydratation des têtes polaires des phospholipides (Rand, 1981). L'idée selon laquelle ce rapprochement résulte de l'action de la protéine de fusion qui imposerait une déformation locale en forme de dôme à au moins une des deux membranes (Kozlov et Chernomordik, 1998) a déjà reçu une confirmation expérimentale (Markosyan *et al.*, 1999). La fusion des deux membranes commence par la fusion des feuillettes externes des deux bicouches lipidiques, qui sont donc reliées par un pont de nature

lipidique (désigné par *stalk* en anglais). L'inhibition dose-dépendante d'une étape précoce de la fusion par des concentrations croissantes de lysophosphatidylcholines dans la couche externe des membranes est une preuve indirecte de l'existence du stalk (Chernomordik *et al.*, 1998 ; Gaudin, 2000).

L'élargissement du stalk permettrait aux deux feuillettes internes de venir au contact l'un de l'autre (**Fig. 14**). A ce stade, on parle d'hémifusion et la bicouche formée par les deux feuillettes internes est appelée diaphragme d'hémifusion. La fusion est complète lorsque les deux feuillettes internes ont fusionné à leur tour. Cette étape nécessite la formation d'un **pore** puis son élargissement au sein du diaphragme d'hémifusion (pour revue : Chernomordik *et al.*, 1999).

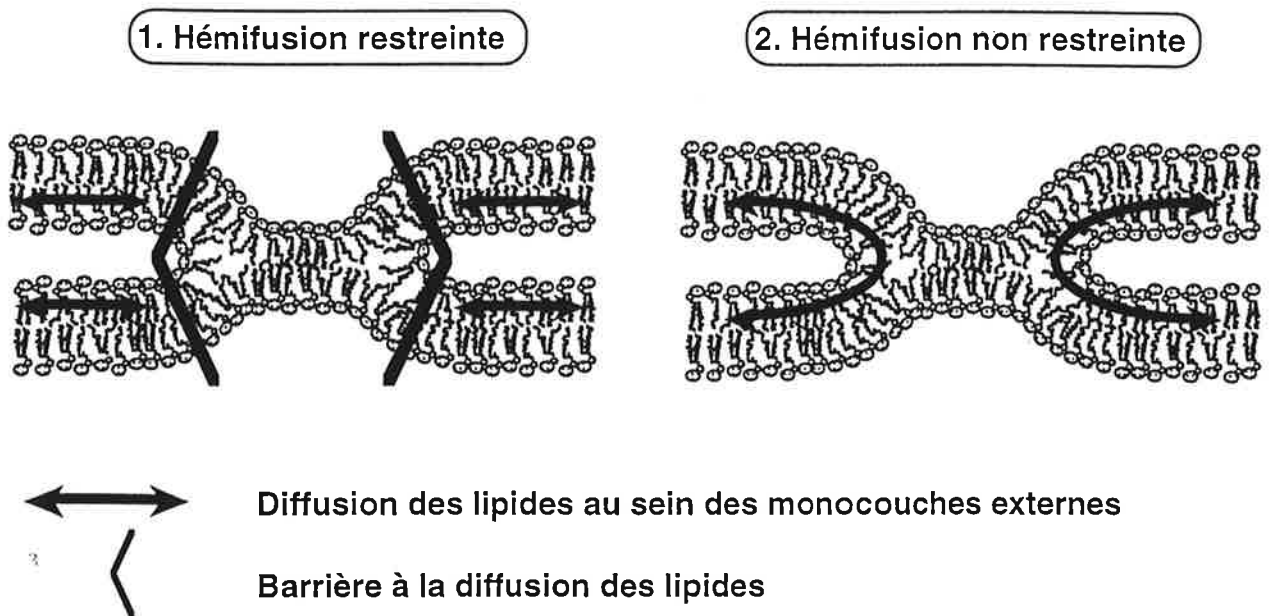


Fig. 15 : Hémifusion. La fusion des feuillettes externes n'est complète que lorsque les lipides diffusent de l'un à l'autre. Quand la fusion est médiée par des protéines, les domaines de celles-ci qui interagissent avec les membranes sont susceptibles de restreindre la diffusion des lipides.

Lorsque la fusion est médiée par des protéines, l'hémifusion peut être non-restreinte ou bien restreinte, selon qu'il y a échange de lipides entre les feuillettes externes des deux membranes ou non (**Fig. 15**). L'hémifusion non-restreinte a été mise en évidence avec GPI-HA, une HA dont le domaine transmembranaire a été remplacé par une ancre glycoposphatidylinositol (Kemble *et al.*, 1994). Dans ces conditions, les réarrangements structuraux de HA sont impuissants à forcer la fusion et cet état est une impasse. L'hémifusion restreinte, elle, est l'état dans lequel le système est bloqué de façon réversible, en refroidissant l'échantillon à 4°C après l'avoir brièvement incubé à pH acide

(Chernomordik *et al.*, 1998). En travaillant à densité suboptimale de HA, Leikina *et al.* (2000) ont apporté la preuve qu'un intermédiaire de ce type existe aussi à 37°C. Contrairement à l'hémifusion non-restreinte, il s'agit d'un intermédiaire productif du processus de fusion puisque, dans le cas d'un blocage à 4°C, il suffit de rehausser la température pour que celui-ci aille à son terme (Schoch *et al.*, 1992 ; Chernomordik *et al.*, 1998).

La réaction de fusion médiée par la G du VR est également stoppée à 4°C, ce qui a permis à Gaudin *et al.* (1993) d'isoler le **complexe de préfusion** du VR (RVPC). Le processus reprend son cours après retour à une température permissive, et la fusion est alors insensible à l'insertion de lysophospholipides (Gaudin, 2000). Le RVPC correspond donc à un stade d'hémifusion restreinte. Mais contrairement à l'intermédiaire décrit par Chernomordik *et al.* (1998), le RVPC avorte si l'on augmente la température à pH neutre ; une seconde étape de protonation est donc nécessaire pour conduire à la fusion (Gaudin *et al.*, 1993 ; Durrer *et al.*, 1995 ; Gaudin, 2000). En revanche si la température est rehaussée à pH acide, le délai qui précède ordinairement la fusion est supprimé, ce qui indique que le RVPC est "prêt" à fusionner, n'attendant vraisemblablement plus que cette deuxième étape de protonation et une température permissive.

3.2.3. La fusion membranaire est catalysée par un complexe multiprotéique

Quelques observations simples permettent de suggérer que la fusion est réalisée grâce à l'action de plusieurs trimères de la protéine fusogène. Dans le cas particulier de G, une incubation à pH 6,7 suffit à compromettre la fusion induite ultérieurement à pH 6, alors que la moitié des spicules du VR est sous la forme N (Gaudin *et al.*, 1993). Plus généralement, le fait que la vitesse de la fusion est proportionnelle à une puissance n , très supérieure à 1, de la densité de la protéine fusogène, appuie cette hypothèse (Blumenthal *et al.*, 1996 ; Bentz, 2000). Le complexe de fusion est généralement représenté comme un anneau de protéines encerclant le pore de fusion (Tse *et al.*, 1993 ; Blumenthal *et al.*, 1996 ; Chernomordik *et al.*, 1998 ; Gaudin, 2000).

La détermination du nombre de protéines participant au complexe de fusion a déjà été tentée pour diverses protéines fusogènes, y-compris HA du virus influenza et la G du VSV. Ces estimations varient de 3 à 6 trimères par complexe (pour revue : Gaudin *et al.*, 1999c). L'observation de la surface du VR dans l'état de préfusion (mutant RAIN ; **3.1.2.**), a amené Gaudin *et al.* (1996) à proposer que le RVPC serait un hexagone ou bien une combinaison d'hexagones.

La restriction de la diffusion des lipides résulte de l'interaction entre la membrane cible et le peptide de fusion des protéines G qui font partie du complexe de fusion (Durrer *et al.*, 1995). D'autre part, Cleverley et Lenard (1998) ont montré que le domaine transmembranaire de la G du VSV participe aux dernières étapes de la fusion. Il en va de même dans le cas de HA (Qiao *et al.*, 1999 ; Melikyan *et al.*, 1999 ; Markosyan *et al.*, 2000). Ces protéines exercent donc des contraintes sur les deux membranes destinées à fusionner. Le rôle du RVPC pourrait être de les focaliser pour plus d'efficacité.

3.3. G est une protéine de fusion originale

La fusion membranaire est un événement banal dans la vie d'une cellule. Elle permet d'abolir une barrière ou d'assurer un transfert de matériel, et c'est dans un but analogue que certains virus l'utilisent pour infecter leur hôte. Bien que les intermédiaires soient vraisemblablement les mêmes dans quelque système que ce soit (3.2.2.), les protéines à l'oeuvre dans ces phénomènes exhibent quelques particularités qui permettent de supposer que leurs mécanismes d'action diffèrent dans le détail.

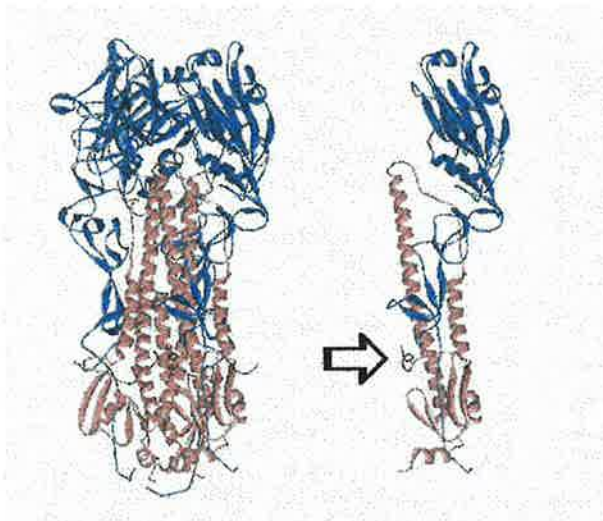


Fig. 16 : Structure de HA du virus influenza. Le fragment cristallisé (à gauche) a été produit par clivage au niveau du résidu 175 de HA2 par la bromélaïne. Il est trimérique et un monomère est représenté à droite. HA1 et HA2 sont respectivement en bleu ciel et en rose. Le peptide de fusion de HA2 est signalé par la flèche et il est coloré en bleu.

La mieux caractérisée des protéines de fusion est une protéine virale : c'est **HA** du virus de la grippe, un Orthomyxovirus (pour revue : Skehel et Wiley, 2000). Son activité de fusion est déclenchée dans l'environnement acide de l'endosome et est détectée en-dessous d'un pH seuil compris entre 5 et 6, selon les souches virales. Comme G, HA est une glycoprotéine transmembranaire de type I

homotrimérique. Contrairement à G, elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur HA0 qui est clivé par une protéase cellulaire à une étape tardive de la voie de sécrétion : les deux polypeptides qui en résultent, HA1 et HA2, sont liés par un pont disulfure (**Fig. 16**). HA1 contient le domaine de reconnaissance de l'acide sialique qui est le récepteur du virus. HA2, qui est transmembranaire et possède un peptide de fusion à son extrémité aminoterminal, est la protéine fusogène. Un fragment protéolytique correspondant à l'ectodomaine de HA a été cristallisé par Wilson *et al.* (1981). Le fragment, appelé **BHA**, a la forme d'une tige surmontée d'une masse globulaire. Cette dernière est une

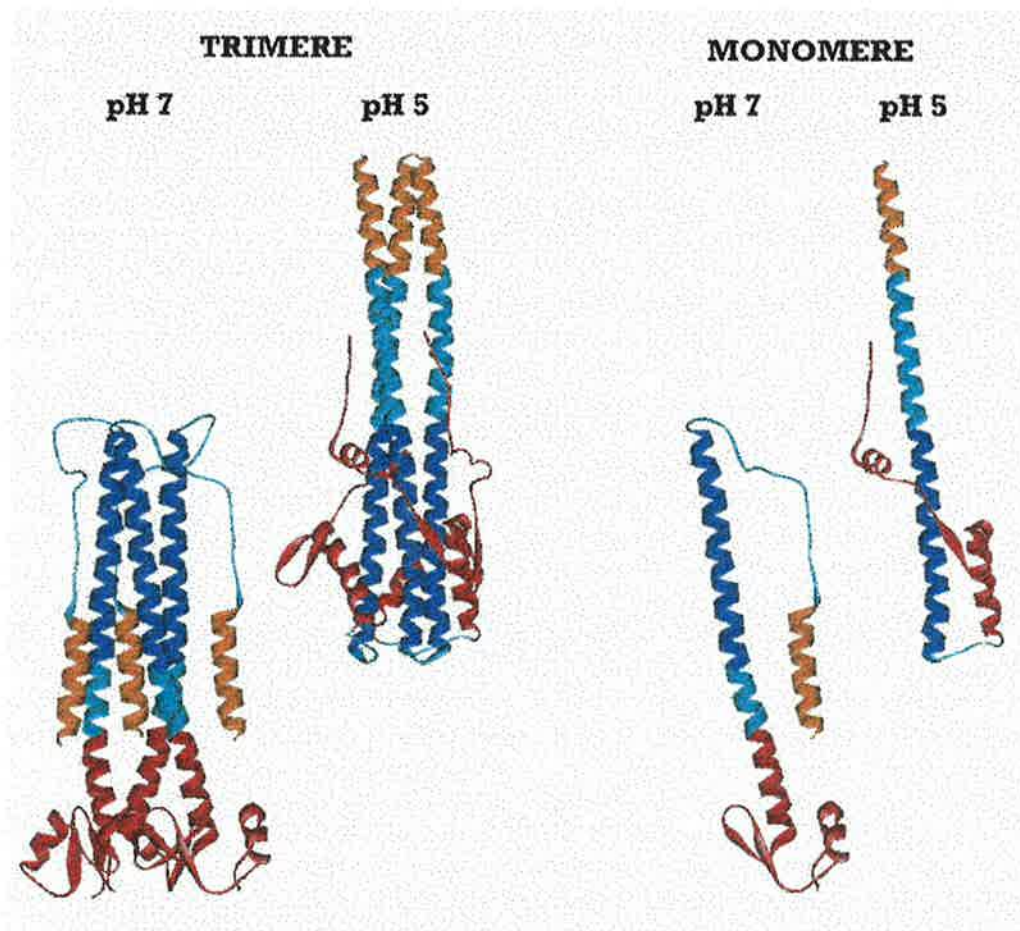


Fig. 17 : Structures comparées de HA2 à pH 7 et à pH 5. A pH acide, la cristallisation de BHA est impossible : les molécules sont agrégées *via* les peptides de fusion à présent dégagés. Des traitements de BHA par la trypsine puis la thermolysine produisent le fragment TBHA2 qui a été cristallisé (Bullough *et al.*, 1994). La comparaison des structures de TBHA2 et de BHA2 indique que la grande hélice de BHA2 (résidus 76 à 129, en bleu et rouge) s'est cassée à l'endroit où était inséré le peptide de fusion : l'hélice 76-129 devient l'hélice 40-104, à l'extrémité de laquelle le peptide de fusion est exposé. Deux segments se sont comportés comme des charnières en subissant une transition hélice-boucle ou réciproquement : ce sont les résidus 57-75 et 105-112 (en bleu ciel). L'hélice 40-56, qui est en aval du peptide de fusion, a été recrutée à la suite des résidus 57-75 tandis que les résidus 113-162 (en rouge) se sont rabattus contre l'hélice 76-104 (en bleu).

partie de HA1 ; elle contient les sites antigéniques ainsi que la poche qui interagit avec l'acide sialique. La tige, essentiellement formée par HA2, est construite autour d'un faisceau trimérique d'hélices torsadées (*coiled-coil*) contre lequel le peptide de fusion est rabattu.

A pH acide, HA subit un changement de conformation irréversible. Au cours de cette transition structurale, le peptide de fusion est exposé ce qui lui permet d'interagir avec les membranes (Tsurudome *et al.*, 1992 ; Weber *et al.*, 1994). La structure de HA à bas pH est très différente de la forme native : les contacts entre protomères HA1 d'une part, entre HA1 et HA2 d'autre part sont détruits. Tandis que la conformation de HA1 ne semble pas affectée de façon significative (Bizebard *et al.*, 1995), celle de HA2 est profondément modifiée, comme en témoigne la structure de TBHA2, un fragment protéolytique de BHA qui est soluble à pH acide (Bullough *et al.*, 1994). HA2 reste trimérique, mais son *coiled-coil* subit des transitions tige-boucle telles, que l'amplitude du mouvement décrit par le peptide de fusion a été estimée à 100 Å (**Fig. 17**). Récemment, le fragment **EHA2** comprenant l'ensemble de l'ectodomaine de HA2 à l'exclusion du peptide de fusion a été produit en bactéries puis cristallisé (Chen *et al.*, 1999). Dans ce cristal, les deux extrémités de la chaîne polypeptidique sont voisines, démontrant sans ambiguïté que le peptide de fusion et le domaine transmembranaire sont localisés à la même extrémité de HA à l'issue des réarrangements structuraux induits à pH acide.

La structure de nombreuses autres protéines fusogènes virales a été résolue. Ces protéines appartiennent aux Rétrovirus, aux Paramyxovirus, aux Filovirus, ainsi qu'aux Flavivirus et aux Alphavirus sur lesquels nous reviendrons plus tard. Les protéines de fusion des trois premiers groupes sont synthétisées sous la forme d'un précurseur qui doit être clivé. Ce clivage crée gp120 et gp41 chez le HIV, SU et TM chez le HTLV, F1 et F2 chez le SV5, Gp1 et Gp2 chez le virus Ebola. gp41, TM, F2 et Gp2 sont transmembranaires et sont donc l'équivalent de HA2. Comme HA2, elles contiennent un motif répété du type $(a b c d e f g)_n$, où les positions *a* et *d* sont occupées par des résidus aliphatiques (Leu et Ile principalement) ; ces heptades répétées sont caractéristiques d'une structure de type *coiled-coil* (pour revue : Lupas, 1997) ce qui a été confirmé expérimentalement en caractérisant la structure des peptides correspondants. Ces fragments de gp41, TM, F1 et Gp2 ont été synthétisés chimiquement ou produits en bactéries, puis cristallisés. Ils adoptent une conformation en *coiled-coil* extrêmement résistante à la chaleur qui ressemble à celle de EHA2 (Chen *et al.*, 1999), et qui est probablement la conformation la plus stable pour ce domaine (**Fig. 18**). Cette conformation n'est

probablement pas celle adoptée dans la protéine native complète mais correspond sans doute à la structure de ces domaines après que la transition structurale a été induite.

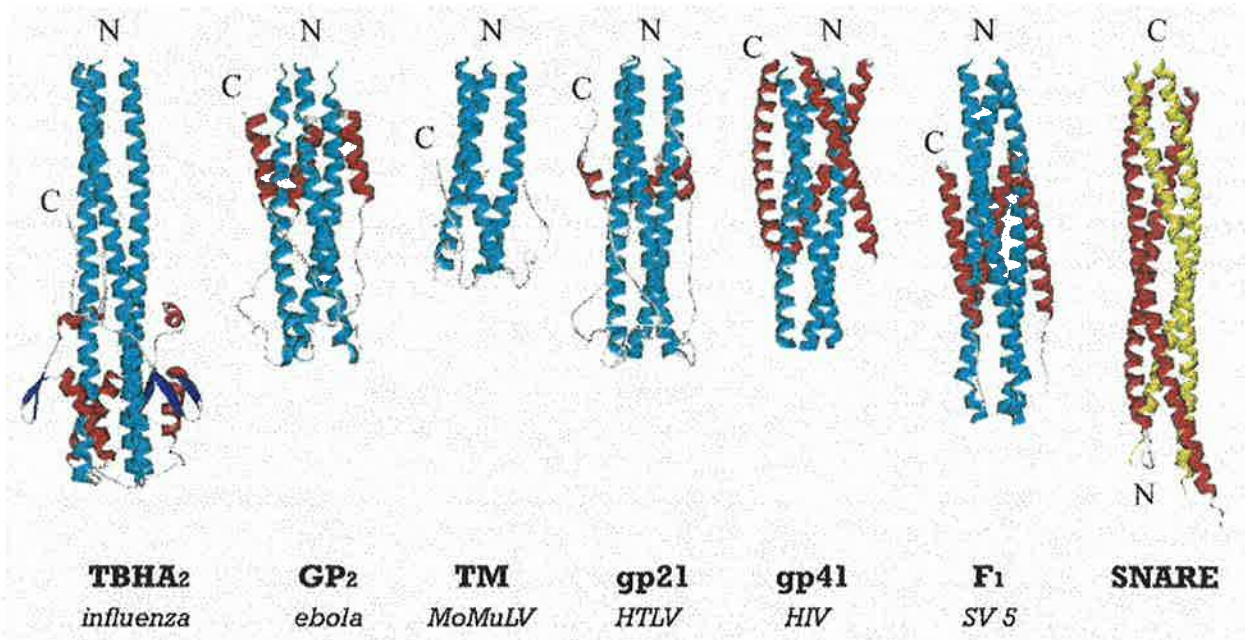


Fig. 18 : Structures comparées de différentes protéines fusogènes virales et cellulaires. Les extrémités amino- et carboxyterminales des fragments sont identifiées par N et C, respectivement. Dans le cas des protéines virales, les hélices du coiled-coil sont colorées en bleu-ciel. L'extrémité N est précédée par le peptide de fusion et l'extrémité C se poursuit par le domaine transmembranaire ; ces deux domaines seraient donc situés à la même extrémité de la protéine. Dans le cas du SNARE, les deux hélices colorées en jaune appartiennent à la syntaxine et à la synaptobrevine, deux protéines transmembranaires ancrées respectivement dans la membrane cible et celle de la vésicule cargo. En rouge, les deux hélices de SNAP 25B (Bullough *et al.*, 1994 ; Weissenhorn *et al.*, 1998 ; Fass *et al.*, 1996 ; Kobe *et al.*, 1999 ; Weissenhorn *et al.*, 1997 ; Baker *et al.*, 1999 ; Sutton *et al.*, 1998)

La grande ressemblance de ces structures entre elles et avec celle d'un complexe impliqué dans la fusion cellulaire (**Fig. 18**) suggère un fonctionnement similaire, conforme au modèle de Carr et Kim (1993) concernant HA. Ce modèle propose que la structure native devient **métastable** par suite du clivage protéolytique post-traductionnel (Carr *et al.*, 1997). Le clivage aurait pour effet d'armer le ressort qui sera relâché à pH acide (HA2 et Gp2) ou lors de l'interaction avec un ou des récepteurs spécifiques (TM et F1). Ce modèle a été largement confirmé par diverses approches consistant : (1) à empêcher la transition boucle - hélice en insérant des prolines dans la boucle (Qiao *et al.*, 1998) et (2) à inhiber la fusion grâce à des peptides synthétiques reproduisant les éléments du coiled-coil central (Jiang *et al.*, 1993 ; Muñoz-Barroso *et al.*, 1998 ; Rimsky *et al.*, 1998). Dernièrement, la combinaison de cette deuxième approche avec l'utilisation de lysophospholipides (**3.2.2.**) a permis de corrélérer

précisément les réarrangements lipidiques avec ceux du core au cours de la fusion médiée par gp41 (Melikyan *et al.*, 2000).

A partir des exemples pour lesquels des informations structurales précises sont disponibles, deux catégories de protéines de fusion ont été répertoriées (Lescar *et al.*, 2001). A l'instar de HA, les protéines de la classe I sont activées par un clivage protéolytique, et sont construites autour d'un coiled-coil. La classe II est actuellement illustrée par deux exemples : E1 du SFV, un alphavirus, et E du TBEV, un flavivirus, qui va nous servir de prototype. Ces protéines ne sont pas clivées et ont donc un peptide de fusion interne. Leurs propriétés de fusion sont déclenchées à bas pH et leur inactivation est irréversible (pour revue : Heinz et Allison, 2000). Au cours de sa synthèse, E est transportée en association avec la protéine **prM** qui est ensuite clivée pour former M. A la surface des virions, l'ectodomaine de E fait alors partie d'un dimère qui a pu être clivé par la trypsine et qui a été cristallisé (Rey *et al.*, 1995). Lorsque les virions sont incubés à pH acide, le dimère se dissocie en monomères qui se réassocient de façon irréversible pour former de nouveaux trimères (Allison *et al.*, 1995). Dans ce cas, c'est le clivage de prM qui a supprimé une des contraintes qui ont façonné la conformation native de E et qui l'a rendue **métastable**. La structure résolue par Rey *et al.* (1995) est complètement différente de la structure de BHA (**Fig. 19**) : la différence la plus significative entre les protéines de classe II et les protéines de classe I est l'absence de coiled-coils dans les premières.

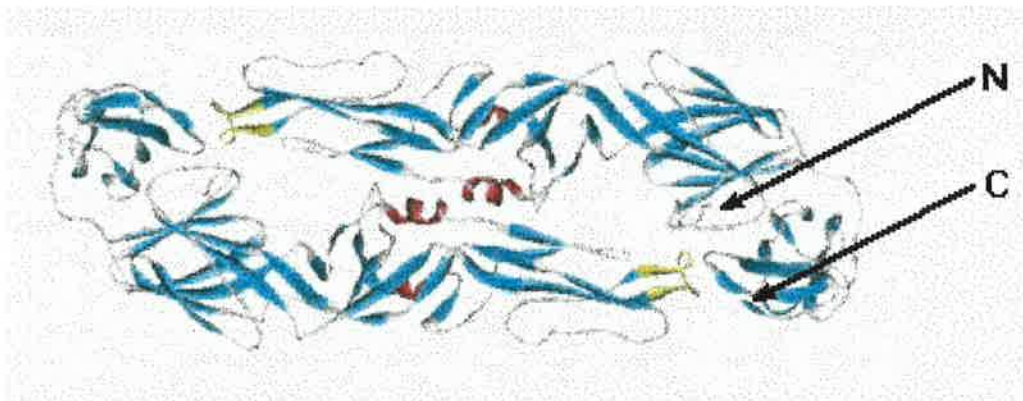


Fig. 19 : Structure de l'ectodomaine de la protéine E du TBEV à pH 7 (Rey *et al.*, 1995). La face présentée correspond à une vue de dessus. Les feuillets sont colorés en bleu-ciel et les hélices en rouge. Les résidus 98-113 qui pourraient constituer le peptide de fusion interne sont colorés en jaune. N et C désignent respectivement les extrémités amino- et carboxyterminales d'un même protomère.

La **G des Rhabdovirus** a un peptide de fusion interne et ne possède pas de coiled-coil, ce qui la rapproche des protéines de classe II. Néanmoins, la réversibilité de la transition structurale induite à pH acide (**3.2.1.**) fait que les Rhabdovirus échappent pour l'instant à cette classification.

Le problème particulier posé par l'étude de la fusion médiée par les glycoprotéines de Rhabdovirus est d'ordre énergétique. On pense couramment que l'énergie nécessaire à la fusion des membranes est apportée par la transition structurale concertée de plusieurs glycoprotéines fusogènes virales (**3.2.2.**), depuis leur forme métastable jusqu'à leur forme finale stable inactive (Ruigrok *et al.*, 1986 ; Carr *et al.*, 1997). La quantité d'énergie libérée lors de cette réaction est d'autant plus importante que l'écart énergétique entre l'état initial et l'état final est grand. Plus cet écart est grand et plus la réaction est loin de l'équilibre. Réciproquement, l'enthalpie libre d'une réaction d'**équilibre** doit être suffisamment faible pour que les deux réactions réciproques aient lieu. Or la transition conformationnelle des glycoprotéines de Rhabdovirus est réversible (**3.1.**), ce qui fait penser que l'énergie libérée est moindre que dans le cas des autres protéines fusogènes virales. Plusieurs hypothèses sont avancées pour reconsidérer le problème, parmi lesquelles :

- 1- la transition structurale en présence de membrane cible serait irréversible, ce qui obligerait à poser le problème autrement, à étudier les propriétés de l'ensemble protéines - membranes ;
- 2- la contribution énergétique relativement faible que représente le changement de conformation de G serait compensée par un grand nombre de molécules de G au sein du complexe de fusion (plus grand que chez les autres protéines fusogènes).

4. Structure et repliement de G

Les travaux concernant la G du VR ont surtout été dédiés à l'amélioration de ses propriétés vaccinales et à l'étude de la fusion membranaire. En revanche, la G du VSV est devenue un modèle courant dans les études consacrées au repliement des glycoprotéines : les données concernant sa biosynthèse et son repliement s'accumulent depuis 25 ans et accompagnent, depuis leur origine, les progrès réalisés dans la caractérisation de la voie de sécrétion et du trafic intracellulaire. Ces données complètent celles qui sont disponibles sur la structure et le repliement de la G du VR.

4.1. Structure et biosynthèse de G

4.1.1. Structure de la G du VR

La G du VR a déjà été décrite partiellement dans la section 2.2.3. Après clivage du peptide signal de 19 résidus, elle est longue de 505 résidus. L'ectodomaine, qui représente l'essentiel de la masse de G, est fait des 439 résidus aminoterminaux. Les 22 résidus suivants constituent le domaine transmembranaire et adoptent vraisemblablement une conformation hélicoïdale. Le polypeptide se termine par un court domaine cytoplasmique, très hydrophile, de 44 résidus (**Fig. 8**). Un modèle grossier a été proposé pour G d'après des observations au microscope électronique (Gaudin *et al.*, 1992) : ce modèle consiste en un domaine globulaire porté par une tige (**Fig. 7**).

La structure primaire contient trois sites potentiels de N-glycosylation aux résidus N37, N204 et N319 (**Fig. 8**). Selon les souches, ces sites sont utilisés plus ou moins efficacement. Le premier n'est semble-t-il jamais utilisé et le dernier l'est systématiquement (Wunner *et al.*, 1985 ; Shakin-Eshleman *et al.*, 1992). Lorsqu'il existe, N204 est glycosylé avec une efficacité moindre voire nulle : ainsi la G de la souche CVS du VR existe sous deux formes différant par la glycosylation de ce site (Wunner *et al.*, 1985) et la G de la souche PV se comporte le plus souvent comme si elle ne possédait que le site N319. La situation est similaire chez le VSV où deux sites de glycosylation existent (N178 et N335) et sont utilisés de manière différentielle par diverses souches. Nous reviendrons plus loin sur la structure des glycanes étant donné leur rôle dans le repliement des glycoprotéines (**4.1.2.**).

La structure covalente de l'ectodomaine de la G du VHSV, un novirhabdovirus, a été déterminée sur la base d'expériences de spectrométrie de masse après clivage protéolytique (Einer-Jensen *et al.*, 1998). Un alignement des séquences de la G de différents rhabdovirus, affiné par la prise en compte des éléments de structure secondaire prédits et complété par la définition des sites antigéniques conformationnels, a permis à Walker et Kongsuwan (1999) de déduire un modèle qui est conforme à celui d'Einer-Jensen *et al.* (**Fig. 8**). Il est intéressant de constater que le modèle de G dérivé des observations de microscopie électronique est compatible avec la distribution des ponts disulfure qui est proposée : les ponts "longue-distance" définissent un domaine fait des 300 premiers résidus qui contient 6 des 7 cystines. Les 60 derniers résidus de l'ectodomaine ne sont pas concernés par ces liaisons et pourraient constituer la tige de 3,5 nm de long décrite par Gaudin *et al.* (1992).

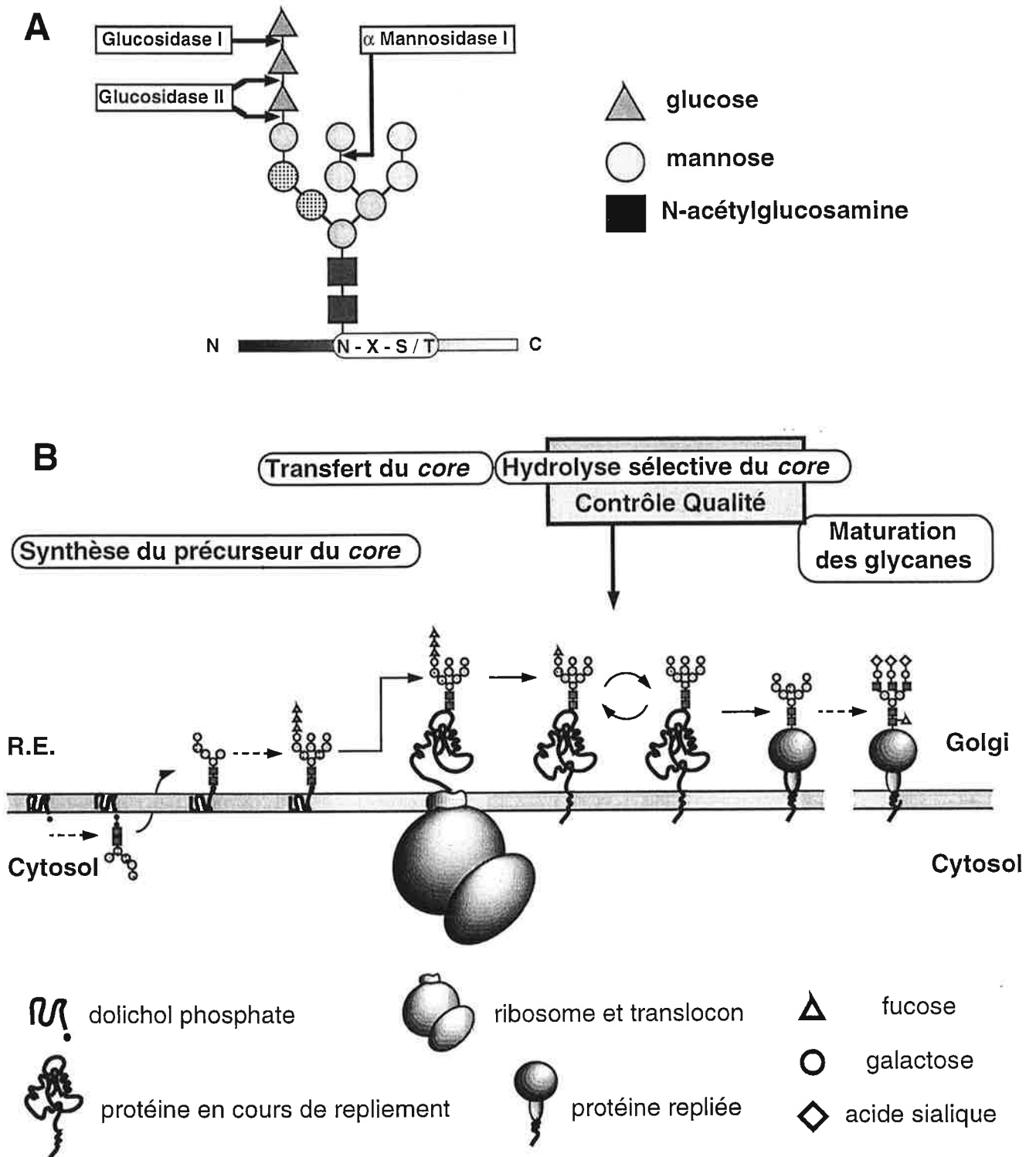


Fig. 20 : Glycosylation de la protéine G. **A.** Structure du core d'un N-glycane. Le core est greffé en bloc par l'oligosaccharyltransférase sur la chaîne latérale de l'asparagine d'un site de glycosylation. Dans le RE, les mannosidases I et II peuvent produire un glycane à 7 résidus mannosyl tandis que les glucosidases I et II hydrolysent séquentiellement les trois glucoses (pour revue : Parodi, 2000). **B.** **Modification du core.** Dans le RE, la structure du core est modifiée en fonction de la qualité du repliement de la chaîne polypeptidique qui le porte (voir texte). Dans le réseau de Golgi, de nouveaux sucres sont greffés sur ce qui reste du core.

4.1.2. Biosynthèse de G

La protéine G est synthétisée par des ribosomes associés au reticulum endoplasmique (RE) et la chaîne polypeptidique en voie d'élongation est transférée dans la lumière du RE, qui est topologiquement équivalente au milieu extracellulaire. La translocation se poursuit jusqu'à ce que la séquence du futur domaine transmembranaire (DTM) arrive au niveau du translocon. Son caractère particulièrement hydrophobe lui permet alors d'être partitionné dans la membrane lipidique. L'élongation s'achève avec la synthèse de la queue cytoplasmique : le monomère de G est libéré et les composants du complexe de traduction sont recyclés.

Au cours de sa synthèse, la chaîne polypeptidique codée par le génome subit quelques modifications : excision du peptide signal, glycosylation et formation des ponts disulfures. La glycosylation consiste en l'addition d'un bloc oligosaccharidique type, *le core*, qui est modifié par diverses enzymes du RE et du réseau de Golgi (**Fig. 20**).

Plusieurs rôles ont été attribués aux glycanes : ils contribuent directement à la structure de la glycoprotéine en interagissant avec le polypeptide (pour revue : Wormald et Dwek, 1999) et leur composition est au coeur d'un système de contrôle-qualité du repliement des glycoprotéines (pour revue : Parodi *et al.*, 2000). A ces rôles structuraux, il faut parfois ajouter une fonction d'adhésion cellulaire (pour revue : Drickamer et Taylor, 1998) ; celle-ci pourrait trouver un écho dans les travaux de Schloemer et Wagner (1975) qui ont montré que le VSV traité à la neuraminidase devient incapable de s'attacher à des cellules L.

Enfin, Gaudin *et al.* (1991a) ont montré que la quasi-totalité des molécules de G incorporées dans les VR est palmitoylée au niveau de la cystéine 460 du domaine transmembranaire (**Fig. 8**). Cette modification a lieu dans un compartiment intermédiaire proche du RE (Bonatti *et al.*, 1989).

4.2. Repliement de G

G est présente dans trois compartiments distincts et l'on considère en général que les trois domaines d'une protéine transmembranaire constituent des domaines de repliement autonomes (pour revue : Doms *et al.*, 1993). Cette opinion est confortée par l'expression réussie de domaines solubles à partir de nombreuses protéines membranaires. Après quelques rappels portant sur le repliement des protéines de manière générale, le cas particulier du repliement d'une glycoprotéine dans la voie de sécrétion sera présenté.

4.2.1. Généralités sur le repliement des protéines

Les expériences de renaturation *in vitro* menée par Anfinsen, et la suite qui leur a été donnée ont permis d'établir quelques règles de base concernant le repliement des protéines (pour revue : Kim et Baldwin, 1990). Ces règles permettent aussi de décrire le repliement *in vivo* quoique des facteurs supplémentaires doivent être pris en compte (pour revue : Frydman, 2001).

Renaturation *in vitro*

Le repliement d'une protéine consiste à acquérir une forme définie, stabilisée par un ensemble de liaisons spécifiques. La structure ainsi formée est composée d'éléments qualifiés de secondaires, tertiaires ou quaternaires selon qu'ils impliquent respectivement des résidus voisins dans la séquence, des résidus dispersés dans la séquence ou bien des résidus appartenant à différents polypeptides. Le repliement d'une protéine est souvent décrit comme une suite de réactions du premier ordre amenant progressivement le polypeptide d'un état non défini, où les liaisons sont aléatoires, à un état défini, dit natif, où une seule combinaison de liaisons est représentée.

Le fait que certaines protéines se replient spontanément sous leur forme native après avoir été dénaturées montre que les interactions caractéristiques de l'état natif sont déterminées en premier lieu par la séquence polypeptidique de la protéine (pour revue : Anfinsen, 1973 ; Huang *et al.*, 1981). A une séquence donnée correspondent des combinaisons d'interactions possibles, parmi lesquelles certaines seront privilégiées d'après des critères thermodynamiques ou cinétiques. Le polypeptide en cours de repliement passe par une série d'intermédiaires que diverses techniques spectroscopiques permettent de caractériser (pour revue : Radford, 2000).

Les intermédiaires sont décrits en termes de compacité, de dynamique moléculaire et de topologie : leurs caractéristiques diffèrent selon la protéine étudiée. L'intermédiaire le plus couramment isolé résulte du regroupement des régions hydrophobes de la protéine (*collapse* hydrophobe) : c'est le globule fondu (*molten globule*) : sa compacité est proche de celle de la protéine repliée et il possède déjà des éléments de structure secondaire (pour revue : Kim et Baldwin, 1990). Le repliement de certaines protéines semble en effet procéder par l'assemblage d'éléments de complexité croissante, les éléments de structure secondaire étant combinés dans la structure tertiaire.

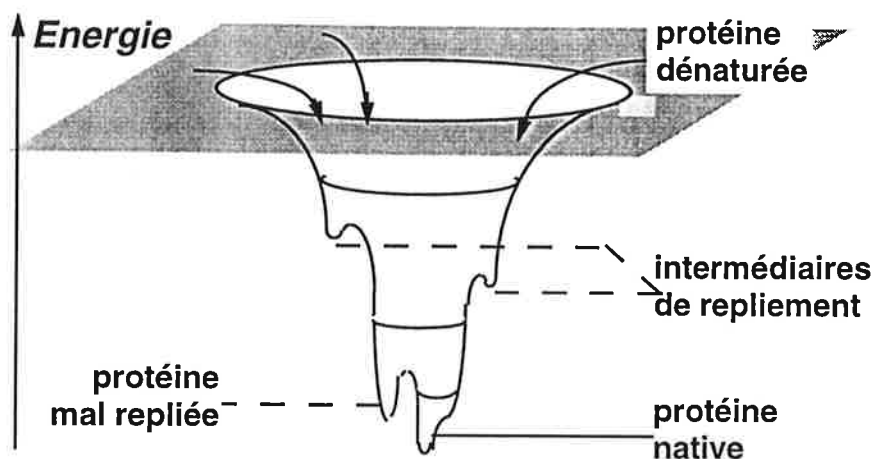


Fig. 21 : Description énergétique du repliement d'un polypeptide (modèle de l'entonnoir, d'après Wolynes et al., 1995). L'état dénaturé est protéiforme ; la somme de l'ensemble des réactions de repliement possibles à partir de l'ensemble des états dénaturés est représentée par une surface.

La description du repliement comme un processus hiérarchique est toujours valide, néanmoins la façon de l'envisager a beaucoup évolué au cours des dernières années (pour revue : Radford, 2000). Il est maintenant admis que le repliement d'une protéine ne suit pas nécessairement une séquence unique d'événements prédéterminés mais qu'un polypeptide dispose de plusieurs alternatives plus ou moins probables pour acquérir sa conformation native à partir d'une multitude de conformations non natives (**Fig. 21**) : c'est le modèle de l'entonnoir (pour revue : Wolynes *et al.*, 1995). Les intermédiaires sont alors parfois considérés comme des pièges d'où le polypeptide devrait sortir avant de poursuivre son repliement (pour revue : Radford, 2000).

Repliement *in vivo*

L'environnement dans lequel le repliement a lieu *in vivo* est caractérisé par une température relativement élevée et par une forte concentration de protéines et d'intermédiaires de repliement. Dans leur ensemble, ces conditions favorisent l'agrégation donc défavorisent le repliement d'une protéine (pour revue : Frydman, 2001).

La cellule remédie à ces difficultés en entretenant un ensemble de protéines destinées à aider le repliement des polypeptides. Les protéines chaperons interviennent pour prévenir l'agrégation, interdire certains intermédiaires, en favoriser d'autres et ainsi accélérer le repliement. Elles sont aussi

capables de défaire des agrégats, offrant ainsi une nouvelle chance de repliement correct à la protéine. La définition originale des chaperons précise que leur intervention est transitoire et n'implique pas de liaison covalente (pour revue : Ellis, 1997). Certaines enzymes catalysent des étapes limitantes comme la formation des ponts disulfures et l'isomérisation des prolines (pour revue : Schiene et Fischer, 2000). Il est fréquent que ces enzymes possèdent aussi une activité de type chaperon indépendante.

Notons enfin que le repliement *in vivo* est co-translationnel. A l'inverse des données précédentes, ceci est susceptible d'en augmenter l'efficacité en limitant le nombre de conformations dénaturées. Cet effet est variable selon les protéines (pour revue : Frydman, 2001) : même une protéine comme la G du VSV peut se replier de façon post-translationnelle *in vivo* (de Silva *et al.*, 1993).

Repliement dans l'environnement du RE

La lumière du RE se distingue chimiquement du cytosol. La concentration en **calcium** y est 10^4 à 10^6 fois plus élevée et son potentiel **rédox** est maintenu légèrement oxydant de telle sorte que les ponts disulfures s'y forment spontanément (pour revue : Zapun *et al.*, 1999).

Des protéines chaperons et des enzymes analogues à celles du cytosol résident dans le RE et assistent le repliement des protéines qui empruntent la voie de sécrétion (pour revues : Zapun *et al.*, 1999 ; Schiene et Fischer, 2000). Ainsi la formation des ponts disulfures est assistée par des disulfide isomérases comme la *Protein Disulfide Isomerase* (PDI) ou la protéine ER-p57. Le RE dispose en outre d'un système original de contrôle-qualité qui aboutit à la dégradation des glycoprotéines dont le repliement est en situation d'échec (pour revue : Parodi, 2000).

L'une des protéines les plus abondantes du RE est le chaperon **BiP**, de la famille des *hsp70* (pour revues : Zapun *et al.*, 1999 ; Frydman, 2001). BiP a deux domaines : un domaine qui lui permet d'interagir avec des oligopeptides et un domaine ATPase qui module l'activité du premier. Cette protéine interagit transitoirement avec des précurseurs non repliés dont elle prévient l'agrégation (**4.2.3.**).

La perturbation de la concentration en calcium à l'aide d'un ionophore spécifique (Lodish et Kong, 1990) ou la perturbation du potentiel rédox à l'aide du DTT (de Silva *et al.*, 1993) provoque l'accumulation dans le RE de chaînes polypeptidiques non repliées ainsi que du chaperon BiP.

L'accumulation de polypeptides mal repliés dans la lumière du RE est en effet perçue comme un signal déclenchant une réponse appropriée, l'UPR (*Unfolded Protein Response*), qui consiste en l'augmentation de la concentration des chaperons et l'arrêt des synthèses de nouvelles protéines (pour revue : Patil et Walter, 2001). Pour toutes ces raisons, le RE est décrit comme un compartiment spécialisé dans le repliement des protéines.

4.2.2. Effet de la glycosylation sur la sécrétion de G

La N-glycosylation est catalysée par une oligosaccharyl-protéine transférase (**Fig. 20**). L'inhibition de cette enzyme par un antibiotique, la tunicamycine, empêche la glycosylation de la G du VSV et entraîne son agrégation dans le RE (Leavitt *et al.*, 1977). Ces résultats ont été confirmés par l'étude d'un mutant dont les deux sites ont disparu (Machamer *et al.*, 1985). Par contre, la mutation d'un des deux sites de glycosylation, quel qu'il soit, est sans effet sur la cinétique du transport de la G du VSV jusqu'à la surface cellulaire (Machamer *et al.*, 1985). Le cas de la G du VR est similaire (Shakin-Eshleemann *et al.*, 1992). D'après ces résultats, c'est davantage la présence que le nombre des N-glycanes qui déterminerait l'effet de la glycosylation sur le transport. Dans ce cas, les N-glycanes pourraient servir de **signal** à la machinerie qui régule la sécrétion. Mais d'autres hypothèses ont été proposées.

Par la suite, l'influence de nouveaux sites de glycosylation sur le transport et le repliement de la G dépourvue de ses deux sites naturels a été examinée (Machamer et Rose, 1988a, 1988b). Les résultats indiquent qu'une certaine flexibilité est permise dans la position des sites de glycosylation, mais que le transport des mutants est toujours moins efficace qu'avec n'importe lequel des deux sites naturels (Machamer et Rose, 1988a). Cette moindre efficacité est liée à leur accumulation dans le RE, sous la forme d'agrégats stabilisés par des ponts disulfures ; ces agrégats ne sont plus détectés dès lors qu'un des deux sites de glycosylation naturels est présent (Machamer et Rose, 1988b). Machamer et Rose ont aussi constaté que l'efficacité de la sécrétion était thermosensible dans le cas de certaines des protéines dont le transport n'est pas optimal (Machamer et Rose, 1988b). Ces observations essentielles démontrent que les N-glycanes influencent le **repliement** de la G du VSV.

Ensemble, ces résultats plaident en faveur d'un rôle global et indirect des N-glycanes sur le transport de la G (Machamer *et al.*, 1985 ; Machamer et Rose, 1988a, 1988b). Le rôle des N-glycanes est global du fait de la relative efficacité du transport de G quelque soit leur position, et il est indirect car il résulte de leur effet sur le repliement de G.

4.2.3. Effet du repliement de G sur sa sécrétion

Le rôle du repliement dans la sécrétion de la G du VSV a pu être étudié indépendamment de la glycosylation grâce au mutant tsO45 (Lafay, 1974). En effet, le repliement de ce mutant est thermosensible : à température non permissive il forme des agrégats dans le RE, mais le rétablissement d'une température permissive permet de réamorcer la sécrétion des molécules de G de façon synchrone (Knipe *et al.*, 1977b). Cette propriété a été utilisée par des biochimistes et des microscopistes pour disséquer la voie de sécrétion *in vivo* (Bergmann *et al.*, 1981 ; Balch et Keller, 1986 ; Presley *et al.*, 1997).

Doms *et al.* (1987) ont établi la séquence des événements qui accompagnent la reprise de la sécrétion de la G du tsO45 à température permissive : la désagrégation de G précède son oligomérisation qui précède elle-même la sortie du RE (Fig. 22). La désagrégation est ATP-dépendante car elle résulte de l'activité de chaperons comme BiP ; elle produit des monomères qui déplacent l'équilibre d'oligomérisation vers le trimère (Zagouras *et al.*, 1991) et la sécrétion reprend.

En conclusion, le mutant tsO45 permet d'associer agrégation et rétention d'une part, repliement et sécrétion d'autre part. Le repliement est donc un facteur limitant pour la sécrétion.

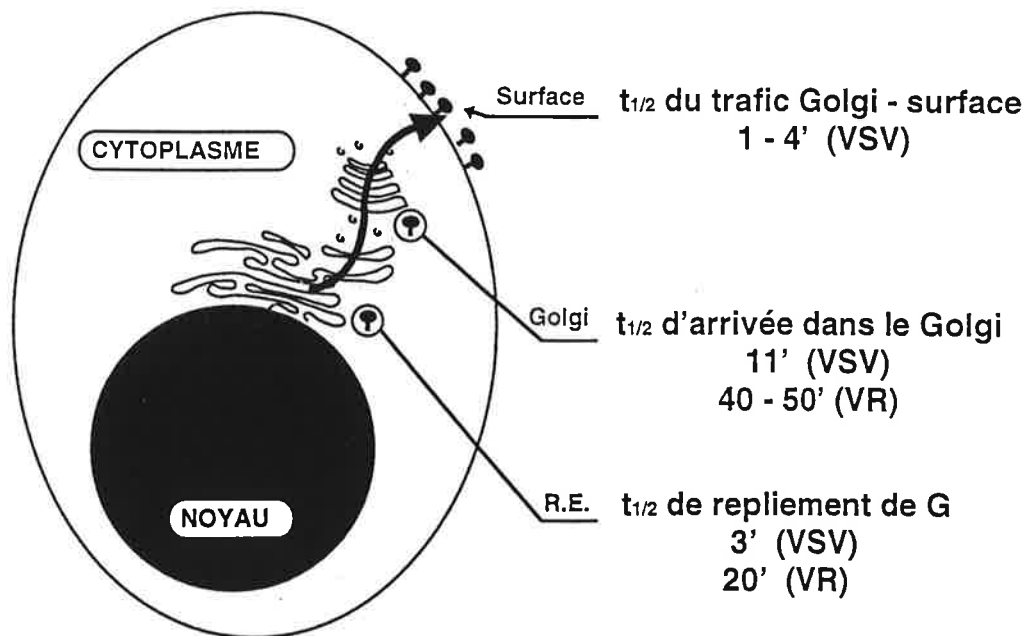


Fig. 22 : Etapes de la sécrétion de la protéine G. D'après les données de Bergmann *et al.* (1981), Doms *et al.* (1987), de Silva *et al.* (1993) et Gaudin *et al.* (1997).

4.2.4. Rôle des N-glycanes dans le repliement de G

La N-glycosylation précède le repliement; les N-glycanes sont donc en mesure de participer au repliement. Gaudin (1997) a montré que la structure des glycanes de la G du VR contribuent aussi au repliement de la protéine. Par ailleurs, Gibson *et al.* (1981) ont montré que plus le nombre de mannoses du core glycosidique est élevé, plus la G est soluble dans un test de repliement *in vitro*. Les N-glycanes pourraient donc favoriser le repliement en augmentant la **solubilité** des intermédiaires de repliement.

Cette hypothèse a été confirmée par des travaux comparant la sensibilité du transport de plusieurs protéines G à la tunicamycine (p. 47) : celles de la souche Orsay (G_{Orsay}), de son mutant tsO45 (G_{O45}) et de la souche San Juan (G_{SJ}). G_{Orsay} se distingue de G_{O45} et de G_{SJ} par une plus grande résistance à la tunicamycine à température permissive (Gibson *et al.*, 1979). Or la comparaison des séquences de ces trois protéines a montré que les quelques résidus différents entre G_{SJ} et G_{Orsay} contribuent à rendre G_{Orsay} plus hydrophile, tandis que le phénotype de G_{O45} est lié au remplacement du Phe₁₈₈ (chez G_{Orsay}) par un résidu Ser (chez G_{O45}), dans une région particulièrement hydrophobe (Gallione et Rose, 1985). Le respect du caractère hydrophobe d'une région semble être crucial pour le repliement de G : ces observations abondent dans le sens de la proposition précédente.

Toutefois le rôle des N-glycanes ne se borne pas à assister le repliement de G. L'équipe de John Bergmann a montré que les résidus glucosyls du core oligosaccharidique (**Fig. 20**) jouent un rôle spécial dans la rétention de certains mutants de la G du VSV dans le RE. La caractérisation structurale des N-glycanes de différents mutants de la G du VSV séquestrés dans le RE, a révélé que certains d'entre eux étaient majoritairement monoglucosylés (Suh *et al.*, 1989). C'était en particulier le cas du tsO45 à température restrictive. Lorsque le transport de G vers le complexe de Golgi a été inhibé, à l'aide d'un ionophore, à température permissive, c'est une forme déglucosylée de G qui s'est accumulée. Le repliement de la G_{O45} étant correct dans ces conditions, les N-glycanes monoglucosylés étaient donc caractéristiques des polypeptides mal repliés.

Finalement, guidés par la description préalable d'une activité glucosyltransférase dans le RE, Suh *et al.* (1989) ont montré que l'accumulation de la forme monoglucosylée de G_{O45} à température restrictive résultait d'un cycle futile entre transfert et hydrolyse du glucose. Cette observation est la plus significative parce qu'elle indique que l'apparition de la forme monoglucosylée est contrôlée par une boucle de régulation.

Suh *et al.* (1989) ont mis en évidence un mécanisme de rétention médié par les sucres, apparemment spécifique des glycoprotéines mal repliées. Le concept de contrôle-qualité du repliement dans la voie de sécrétion a pris corps à travers ces observations et d'autres qui sont exposées ci-dessous.

4.3. Contrôle de la qualité du repliement

Le RE est le premier compartiment de la voie de sécrétion ; c'est là que les protéines néosynthétisées se replient. Cet environnement à haut risque d'agrégation possède des moyens particuliers pour assurer, mais aussi pour contrôler la qualité du repliement.

4.3.1. Rétention des polypeptides mal repliés : une particularité du RE

De Silva *et al.* (1990) ont démontré que l'agrégation de G_{O45} à température non permissive, est une propriété spécifique du RE. Ils ont montré, notamment grâce à l'incubation de particules virales du VSV tsO45 dans différentes fractions de lysat cellulaire à température restrictive, que seul le RE est capable de réagir à un repliement défectueux.

Au cours des 3-4 premières minutes qui suivent sa synthèse, la G du VSV participe à des agrégats hétérogènes contenant aussi BiP (de Silva *et al.*, 1993). L'interaction de BiP avec G est stabilisée lorsque le repliement est dans une impasse, comme c'est le cas en présence de DTT ou à température restrictive pour la G du tsO45 (Machamer *et al.*, 1990 ; de Silva *et al.*, 1993). En suivant la localisation de la G_{O45} aux longs temps de chasse à température non permissive, Hammond et Helenius (1994a) ont montré que même dans ces conditions, la G a accès au compartiment proximal du Golgi, le *cis*-Golgi, d'où elle est renvoyée vers le RE. Les données d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation présentées indiquent que G circule sous forme de complexe avec BiP. Cette interaction est susceptible de contribuer à la rétention de G dans le RE.

A l'instar de BiP, le RE assure un contrôle-qualité à travers des mécanismes de rétention. La rétention de certaines protéines pourrait résulter de leur liaison à des protéines résidentes du RE ; elle pourrait aussi résulter de l'exclusion des protéines agrégées des sites où bourgeonnent les vésicules de sécrétion (pour revue : Ellgaard *et al.*, 1999).

4.3.2. Des chaperons spécialisés assistent le repliement des glycoprotéines

Alors que BiP est capable d'assister le repliement de toutes les protéines synthétisées dans le RE, quelque soit leur nature, les données de Suh *et al.* (1989) ont montré que les glycoprotéines sont soumises à un contrôle spécifique (4.2.4.). Le mécanisme de rétention dont il est question est assuré par des chaperons spécialisés, qui sont caractéristiques du RE (pour revue : Parodi, 2000).

Le core des N-glycanes contient initialement trois résidus glucosyl que les glucosidases I et II, enzymes résidentes du RE, éliminent séquentiellement en quelques minutes (**Fig. 20**). Toutefois, Suh *et al.* (1989) ont montré que dans certaines conditions, des polypeptides monoglucosylés s'accumulent dans le RE. La reglucosylation des glycanes est catalysée par l'**UDP-glucose glycoprotéine glucosyltransférase** (pour revue : Parodi, 2000). C'est une protéine soluble de 160 kDa qui réside dans le RE. Des expériences de compétition entre protéines ayant subi des traitements spécifiques (dénaturation, déglucosylation) ont permis de montrer que l'UGGT reconnaît à la fois le premier résidu GlcNAc du core et des séquences peptidiques accessibles dans les protéines qui ne sont pas repliées (Sousa et Parodi, 1995). Par ailleurs, la capacité de différents mutants de la nucléase de staphylocoque à être glucosylés par cette enzyme a été trouvée d'autant plus faible que leur conformation est plus stable et que leur spectre dichroïque est proche de celui de la conformation native (Sousa et Parodi, 1995). L'UGGT a donc les propriétés d'un **senseur** capable de discriminer les glycoprotéines en fonction de leur état de repliement. Conformément aux observations de Suh *et al.* (1989), les polypeptides déglucosylés par la glucosidase II sont reglucosylés par l'UGGT lorsqu'ils sont mal repliés (**Fig. 23**).

L'interaction de l'UGGT avec son substrat n'explique pas la rétention de celui-ci dans le RE puisque l'enzyme est présente en quantité catalytique. La rétention des polypeptides monoglucosylés dans le RE est assurée par d'autres protéines qui ont été découvertes indépendamment.

La principale d'entre elles est la **calnexine** (CNX). La CNX fut d'abord décrite comme une phosphoprotéine du RE proche du translocon (Wada *et al.*, 1991). Des données ont été rapidement accumulées concernant l'interaction transitoire de la CNX avec un certain nombre de protéines du système immunitaire au cours de l'assemblage de leur structure quaternaire (Degen *et al.*, 1992 ; Hochstenbach *et al.*, 1992 ; David *et al.*, 1993). La démonstration d'une interaction sélective avec les intermédiaires de repliement de diverses glycoprotéines sécrétées par des hépatocytes (Ou *et al.*,

1993) a fait de la CNX l'élément emblématique du contrôle-qualité dans le RE.

La CNX est une protéine transmembranaire, longue de 572 résidus, dont 462 sont dans la lumière du RE. La structure primaire de son ectodomaine est très proche de celle de la calréticuline (CRT), protéine luminale de 400 résidus, dont les propriétés sont similaires vis-à-vis du repliement (pour revue : Parodi, 2000). CNX et CRT ne sont cependant pas équivalentes : la phosphorylation de la partie cytoplasmique de la CNX régule une interaction directe avec le ribosome (Chevet *et al.*, 1999) tandis que la CRT est impliquée dans divers phénomènes de régulation.

Les informations collectées sur le fonctionnement de l'UGGT, de la CNX et sur les propriétés particulières du RE dans la régulation de la sécrétion provenaient de systèmes différents. Une description unifiée illustrant le fonctionnement du contrôle-qualité exercé par le RE fut présentée pour la première fois par Hammond *et al.* (1994).

Les deux glycoprotéines virales alors les mieux caractérisées, HA du virus influenza et la G du VSV, furent marquées et immunoprécipitées après différents traitements permettant de bloquer la maturation des sucres. Ces expériences montrèrent que les espèces interagissant avec la CNX étaient majoritairement monoglucosylées, conformément aux observations de Suh *et al.* (1989). Un modèle du **système de contrôle-qualité** du repliement des glycoprotéines dans le RE a alors été proposé par l'équipe d'Ari Helenius (**Fig. 23**). Dans ce modèle, l'UGGT est sensible à la qualité du repliement et modifie la structure du N-glycane en conséquence. La composition du N-glycane est un signal auquel la CNX est sensible et ce signal est actualisé en permanence par le jeu combiné de l'UGGT et de la glucosidase II.

Ce modèle présente la CNX et la CRT comme des lectines résidentes dépourvues d'activité chaperon, seule l'UGGT étant sensible à la conformation des protéines. L'importance de la présence d'un glycane monoglucosylé a été confirmée dans le cas de diverses protéines, y compris la G du VSV (pour revue : Parodi, 2000). Toutefois, David Williams et ses coéquipiers ont montré que la CRT et l'ectodomaine de la CNX sont capables de prévenir l'agrégation *in vitro* de protéines non glycosylées ou déglycosylées (Ihara *et al.*, 1999 ; Saito *et al.*, 1999). Un tel rôle peut donc être envisagé *in vivo* également. Quoi qu'il en soit, des facteurs de repliement supplémentaires ont été greffés au système de contrôle-qualité introduit par Hammond *et al.* (1994) : le fonctionnement intégré de cette machinerie est résumé ci-dessous.

4.3.3. Les chaperons du RE forment une matrice capable d'assister le repliement

Les glycoprotéines néosynthétisées participent transitoirement à des complexes avec plusieurs chaperons, dans ce qui a été décrit comme un réseau (de Silva *et al.*, 1993 ; Tatu et Helenius, 1997). L'étude cinétique de la prise en charge de différentes glycoprotéines virales par ce réseau a permis d'établir que les glycoprotéines qui possèdent un site de glycosylation fonctionnel dans les 50 premiers résidus, interagissent d'abord avec les chaperons CNX/CRT au lieu de BiP (Hammond et Helenius, 1994b ; Molinari et Helenius, 2000). D'après cette règle, la G du VR interagit d'abord avec BiP puis avec CNX, ce qui est conforme aux résultats de Gaudin (1997).

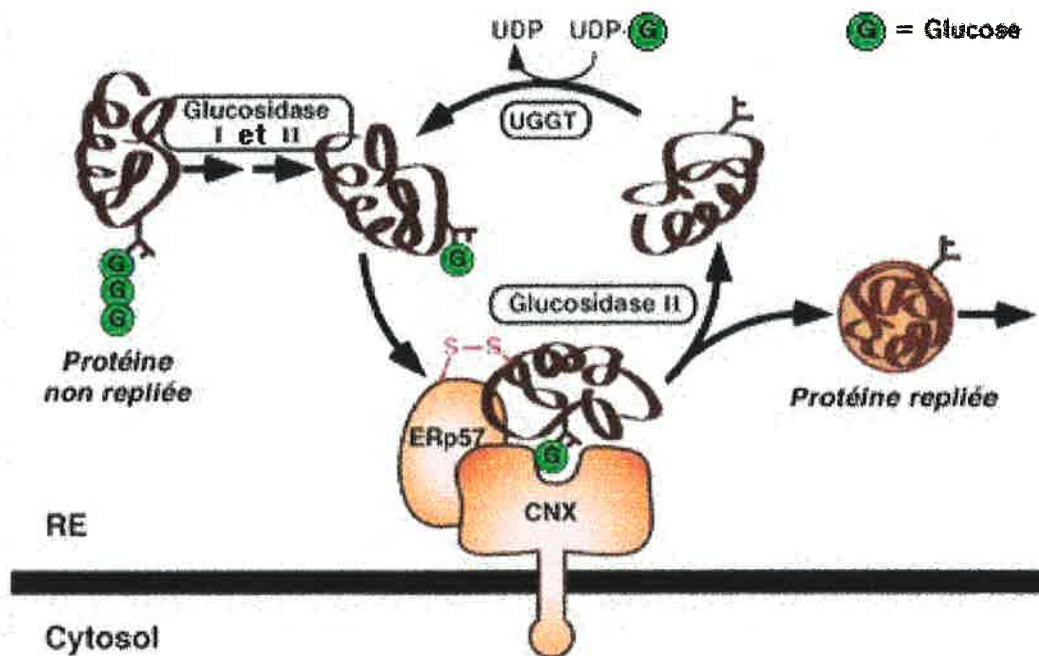


Fig. 23 : Contrôle-qualité du repliement des glycoprotéines dans le RE (d'après Ellgaard *et al.*, 1999). Les glucosyls (G) du core sont hydrolysés successivement. Les polypeptides à la fois monoglucosylés et non repliés sont reconnus par CRT ou CNX (seule représentée ici). Ils sont alors capables d'établir des ponts disulfures intercaténaux avec ERp57, une disulfide isomérase complexée à CNX / CRT (Molinari et Helenius, 2000). La glucosidase II hydrolyse le dernier glucosyl et le polypeptide échappe au complexe CNX-ERp57. Si le repliement est inachevé, l'UGGT le prend pour substrat et lui greffe un glucosyl. Ce cycle se poursuit jusqu'à ce que, convenablement replié, le polypeptide reste déglucosylé et sorte du RE.

Des interactions entre chaperons ont été mis en évidence dans ce réseau à l'aide d'agents pontants. Oliver *et al.* (1997, 1999) ont ainsi détecté la protéine ERp57 dans des complexes impliquant à la fois une glycoprotéine en cours de synthèse et la CNX / CRT, puis dans des complexes binaires avec la CNX / CRT (**Fig. 23**). ERp57 est un homologue de la PDI (4.2.1.). Ces protéines ne sont pas

équivalentes : en effet, *in vitro*, la présence de CNX/CRT stimule l'activité de ERp57 mais semble interférer avec celle de la PDI (Zapun *et al.*, 1998).

Le réseau de chaperons du RE contient des protéines aux fonctions redondantes : CNX et CRT, ERp57 et PDI en sont deux exemples. La complémentarité de ces différentes protéines pourrait permettre au RE de répondre à des situations plus diverses. Par exemple, des résultats récents obtenus chez *S. cerevisiae* (Gillece *et al.*, 1999) indiquent que la PDI pourrait jouer un rôle dans la dégradation des protéines dont le repliement est en échec (*ER Associated Degradation*).

Le RE est un carrefour où certaines protéines sont destinées à être sécrétées et d'autres à être dégradées. De plus, l'accumulation de protéines mal repliées déclenche une réponse qui a pour fonction d'ajuster la quantité de chaperons (4.2.1.) (pour revue : Patil et Walter, 2001). Ces différentes fonctions régulatrices sont assurées par des protéines résidentes prenant part au réseau qui s'organise autour des protéines néosynthétisées. Les bases moléculaires du tri des protéines du RE sont partiellement connues. De même que l'UGGT, Ire1p, un senseur de l'UPR, est sensible à des critères de repliement. Par contre le recyclage d'une glycoprotéine par ERAD semble être déterminé par la structure du glycane, l'hydrolyse progressive des résidus mannosyl du core (**Fig. 20**) témoignant de l'âge du polypeptide (Tokunaga *et al.*, 2000).

4.4. G est un modèle dans l'étude du repliement

Les protéines ayant permis de caractériser le système de contrôle-qualité du repliement dans la voie de sécrétion appartiennent à différentes catégories aux caractéristiques complémentaires. Ce sont des protéines du système immunitaire -immunoglobulines, récepteurs du Complexe Majeur d'Histocompatibilité, récepteurs des cellules T- qui ont permis de montrer le rôle de partenaires du repliement comme BiP et la CNX. Leur assemblage est d'autant mieux contrôlé qu'il en va de la survie de la cellule lorsqu'elle est confrontée aux cellules du système immunitaire (pour revue : Whitton et Oldstone, 1996). Par ailleurs, les cellules hépatiques sont un modèle pour l'étude de la sécrétion : des α -antiprotéases et d'autres protéines sécrétées par les hépatocytes ont permis de généraliser des observations particulières (Ou *et al.*, 1993). Enfin de nombreux résultats clefs concernant le repliement des protéines empruntant la voie de sécrétion ont été obtenus par des équipes travaillant avec des glycoprotéines virales (pour revue : Ellgaard *et al.*, 1999). Elles constituent en effet un système

avantageux pour l'étude du repliement des protéines dans le reticulum endoplasmique (RE).

La particularité des protéines d'enveloppe virales tient au fait qu'elles sont l'antigène principal du virus qui les porte à sa surface (3.1.2). Des techniques immunologiques simples permettent donc de les séparer du reste de la cellule où elles sont produites. Des collections d'anticorps monoclonaux permettent de caractériser différentes formes de l'objet étudié : certains épitopes sont conformationnels, d'autres sont spécifiques de l'oligomère, et ces caractéristiques deviennent immédiatement accessibles à l'expérience. Le rôle de différents facteurs sur leur biosynthèse, la synthèse des ponts disulfures, l'interaction avec les chaperons, les liens entre oligomérisation et repliement, le trafic intracellulaire peuvent alors être étudiés à l'aide de protocoles couplant l'immunoprécipitation à des techniques appropriées.

Le deuxième avantage est aussi d'ordre technique : les protéines virales peuvent être étudiées sur des cellules infectées. Du point de vue historique, il faut signaler que les protocoles d'infection virale sont plus efficaces et plus simples que les techniques de transfection ; de plus, certains virus inhibent les synthèses cellulaires ce qui est susceptible de simplifier l'analyse. Le troisième avantage fait tout l'intérêt de travailler avec un système vivant : les virus se reproduisant, ils peuvent être soumis à une pression de sélection et des mutants peuvent être caractérisés.

5. Objet de ce travail

G se prête difficilement à une étude structurale fine : la présence d'un domaine transmembranaire, c'est-à-dire particulièrement hydrophobe, en complique la cristallogénèse, donc l'étude par radiocristallographie. De plus elle est glycosylée, or la maturation des sucres est source d'hétérogénéité, qui est elle-même susceptible de nuire à l'édification d'un cristal de qualité. Enfin, l'ectodomaine est trop gros pour être étudié par RMN.

L'usage chez les cristallographes est de faire un problème "soluble" d'un problème "insoluble" : le plus souvent, un fragment soluble de la protéine peut-être étudié à la place de la protéine complète, mais des protéines solubilisées par des détergents ont parfois été cristallisées avec succès. Les équipes de Spitalnik et de Gaudin ont entrepris l'étude d'un fragment soluble correspondant à

l'ectodomaine. Wojczyk *et al.* (1998) ont réduit la microhétérogénéité de la protéine (souche ERA) en ne conservant que le site de glycosylation N319. Toutefois, il est clair d'après leurs propres travaux, que l'antigénicité de leur protéine est altérée. De fait, Gaudin *et al.* (1999b) ont montré que l'absence d'ancrage membranaire résulte en un repliement alternatif, antigéniquement proche de la forme I. La question se posait alors de comprendre de quelle façon intervient l'ancrage membranaire dans l'acquisition de sa conformation par l'ectodomaine. Les moyens mis en oeuvre et les réponses apportées à cette question font l'objet de la première partie de ce document.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié la région impliquée dans la régulation des changements de conformation qui avait été identifiée par Gaudin *et al.* (1996). Des mutations dans cette région sont associées au ralentissement du changement de conformation de N vers I à pH acide. Le dipeptide His-Pro, voisin des sites mutés, est présent chez toutes les protéines G de *Rhabdoviridae*. Il se trouve quarante résidus en amont de l'ancre transmembranaire. Différentes techniques spectroscopiques ont été utilisées pour étudier la structure de deux oligopeptides centrés sur ce motif. Cette approche a été complétée par des expériences de mutagenèse dans la protéine complète, qui ont été faites dans l'axe des travaux de la première partie.

Enfin, les deux parties précédentes ayant apporté quelques éléments nouveaux sur la structure de G, un test de fusion de cellules transfectées a été mis au point pour tester ces connaissances nouvelles dans le cadre des relations structure-fonction.

Matériels & Méthodes

- | | |
|--|--------------|
| 1. Bactéries et biologie moléculaire | p. 57 |
| 2. Virus et cellules, biologie cellulaire | p. 60 |
| 3. Biochimie | p. 63 |
| 4. Biophysique | p. 67 |

Matériels & Méthodes

1. Bactéries et biologie moléculaire

1.1. Bactéries hôtes, plasmides et transformation

Les différents clones de G utilisés dans ce travail ont été construits dans le plasmide pcDNA1 (InVitroGen) qui est propagé dans *E. coli* MC1061/P3, en présence d'ampicilline et de tétracycline. Certains produits de réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été clonés dans le plasmide pGEM-T (Promega) sélectionné dans les bactéries XL1-Blue en présence d'ampicilline. Les constructions codant des protéines en fusion avec la GST ont été faites dans le plasmide pGEX-4T1 (AP-Biotech). Le plasmide codant le propeptide du DAF nous a été donné par Jean Dubuisson (Cocquerel et al., 1998). Le plasmide codant le domaine iiGCN4 nous a été donné par Winfried Weissenhorn (Weissenhorn et al., 1998).

1.2. Milieux de culture des bactéries

LB :

bactryptone	1%	(pH 7,5)
extrait de levure	0,5%	
NaCl	1%	

2xYTA :

tryptone	1,6%	(pH 7,5)
extrait de levure	1%	
NaCl	0,5%	

TYM :

bactryptone	2%	
extrait de levure	0,5%	
NaCl	0,1 M	
MgSO ₄	10 mM	

Antibiotique(s) :

ampicilline	25 µg/ml
tétracycline	15 µg/ml

1.3. Préparation des bactéries compétentes

50 ml de TYM sontensemencés avec 5 ml d'une préculture en phase exponentielle de croissance, dont la densité optique (D.O.) à 600 nm avoisine 0,5. Cette culture est diluée à son tour dans du TYM quand sa D.O. à 600 nm dépasse 0,5. La culture est arrêtée par refroidissement dans la glace lorsque la D.O. atteint 0,6. La suspension est centrifugée à 4°C, 20 minutes, à 3500 rpm dans le rotor JA-14 (Beckman). Le culot est resuspendu aussi doucement que possible dans 50 ml de TFB1 et les bactéries sont de nouveau centrifugées (3500 rpm, 10 minutes). Le culot est finalement repris dans 10 ml de TFB2 qui sont aliquotés et stockés à -80°C.

TFB1 :

CH ₃ COOK	30 mM (pH 5,7)
KCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycérol	15%

TFB2 :

NaMOPS	10 mM (pH 7)
CaCl ₂	75 mM
KCl	10 mM
Glycérol	15%

1.4. Transformation des bactéries compétentes

Le plasmide est incubé avec les bactéries compétentes (2µl de la réaction de ligation et 100µl de bactéries) sur la glace pendant 45'. Le mélange est soumis à un choc thermique à 42°C pendant 2', puis complété par 700 µl de LB préchauffé. Il est ensuite incubé sous agitation pendant 1 heure à 37°C avant d'être étalé sur milieu sélectif.

1.5. Clonages : PCR, digestions, purifications**1.5.1. Digestions et ligations**

Réactions de restriction : approximativement 4 U.µg⁻¹.(site de restriction)⁻¹ pendant 3-4 heures à la température recommandée. Lors de digestions successives, la première enzyme a été préalablement

inactivée par la chaleur et l'échantillon a été précipité à l'éthanol.

Réactions de déphosphorylation : 1 U de phosphatase intestinale de veau par picomole d'extrémités (5'), pendant au moins 60 minutes à 37°C. La phosphatase a été inactivée à 75°C pendant 20 minutes en présence de 5mM EDTA. L'échantillon a ensuite été précipité à l'éthanol.

Réactions de ligation : 10 femtomoles de vecteur linéarisé déphosphorylé et 30-100 femtomoles pour chaque insert ont été incubés dans 10 µl pour la nuit à 15°C en présence de 1 U de T4 DNA ligase.

1.5.2. Conditions des PCR

Conditions opératoires :

selon les indications du fabricant (tampon avec magnésium), dans un volume de 50 µl

chaque oligonucléotide	1 µM
dNTP	200 µM
polymérase (<i>Taq</i> / <i>Tfu</i>)	1 - 1,5 U
matrice	env. 50 ng

Programme :

- 95°C, 5'
- 20 x (95°C, 1' + 55°C, 1' + 72°C, 45" - 1')
- 10 x (95°C, 1' + 55°C, 1' + 72°C, 1' - 1'15")
- 72°C, 10' (sauf *Tfu*)
- 4°C, ∞

Mutagenèse selon Quickchange (Stratagène) :

(protocole selon les indications du fabricant)

chaque oligonucléotide	125-150 ng
dNTP	400 µM
<i>Pfu turbo</i>	2,5 U
matrice	15 ng

Programme :

- 95°C, 30"
- (95°C, 30" + 55°C, 1' + 68°C, 15') x *c* où *c* = 12 pour les substitutions simples, et *c* = 18 pour les délétions / insertions / substitutions multiples.

1.5.3. Préparation des plasmides et des fragments d'ADN

La purification de plasmides à partir d'*E. coli* a été réalisée selon le protocole du Maniatis (Sambrook et al., 1989), ou à l'aide des kits QIAspin et QIAprep maxi (QIAGEN) selon la qualité et la quantité souhaitées. La purification d'ADN (produit PCR ou plasmide linéarisé) à partir de gel d'agarose (tampon TAE) a été faite grâce au kit QIAEX II (QIAGEN).

1.6. Analyses

1.6.1. Gel d'agarose

Tampon TBE (0,5x) :

Tris-Borate 45 mM (pH 8)
EDTA 1 mM

Tampon TAE (1x) :

Tris-Acétate 40 mM (pH 8)
EDTA 1 mM

1.6.2. Séquençage

Les réactions de séquence ont été réalisées manuellement à l'aide du kit T7 (Pharmacia) à l'exception de la construction G_{p75}, qu'il a fallu confier à Cybergène (Evry) pour lever une incertitude.

Gel de séquence :

solution d'acrylamide	24 ml	APS 10%	0,8 ml
solution d'urée	56 ml	temed	5,6 µl

Préparation des solutions du gel de séquence :

Solution d'acrylamide :

acrylamide/bis- (29/1)	250 ml
urée	233,5 g
TBE 10x	50 ml
H ₂ O	qsp. 500 ml

Solution d'urée :

urée	233,5 g
TBE 10x	50 ml
H ₂ O	qsp. 500 ml

2. Virus et cellules, biologie cellulaire

2.1. Virus

Tous les travaux présentés dans le cadre de l'étude de la glycoprotéine du virus de la **rage** ont été réalisés avec la souche PV (Pasteur Vaccin) du virus de la rage. La mutagenèse a été réalisée à partir de l'ADNc codant G_{WT} cloné dans pcDNA1 (Gaudin et al., 1999). Le virus recombinant de la **vaccine** VTF7-3 (Fuerst et al., 1986) code la polymérase T7 (don de Bernard Moss).

2.2. Culture de cellules eucaryotes

Toutes les expériences en cellules ont été réalisées avec des cellules BSR, un sous-clone des cellules BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*). Ces cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri de 6 cm de diamètre (Moyennes Petri ; MP) ou de 3,5 cm de diamètre (Petites Petri ; PP) selon les expériences

auxquelles elles sont destinées. Elles sont incubées dans du milieu essentiel minimum (MEM, Gibco) supplémenté en serum de veau 10%, dans une étuve à 37°C sous atmosphère contenant 5% de CO₂.

PBS :

NaCl	136 mM	Na ₂ HPO ₄	3 mM
KCl	2,7 mM	KH ₂ PO ₄	1,5 mM

2.3. Infection et transfection des cellules

2.3.1. Infection par le VR (pour la production de Gs)

Le stock de VR est conservé à -80°C. Les cellules sont infectées au moyen du stock dilué dans du TD-tryptose 5%, avec une multiplicité d'infection de 5 (5 unités formant plaque par cellule). Après cette phase d'adsorption de 30 minutes à température ambiante, le milieu est complété par 1,7 ml de MEM contenant 4% de serum de veau et les boîtes sont placées à l'étuve.

2.3.2. Transfection au Transfectace

L'expression transitoire des plasmides dans des cellules en culture a été réalisée grâce au protocole de Rose et al. (1991), en utilisant le virus recombinant T7 de la vaccine. Selon les expériences, les cellules ont été cultivées à demi-confluence sur des MP (immunoprécipitations et résistance à l'Endo H) ou des PP (sédimentation sur gradient de saccharose). Elles ont été infectées par la vaccine à une multiplicité d'infection de 5. Après une phase d'adsorption de 45 minutes à température ambiante, les cellules ont été transfectées avec 8 µg de plasmide (5 µg dans le cas des PP) préincubés pendant 15 minutes à température ambiante avec la solution de transfectace (Rose et al., 1991) puis dilués dans du MEM. Après trois heures dans l'étuve à 37°C, le milieu a été complété par du MEM, 10% de serum de veau, jusqu'à contenir 4% de serum de veau.

Préparation du Transfectace :

4 mg de bromure de diméthyl-, dioctadécyl ammonium (DDAB) et 10 mg de dioléyl L-α phosphatidyl éthanolamine (DOPE) sont dissouts dans 1 ml de chloroforme dans un tube Corex. Le chloroforme est évaporé dans un lyophilisateur, puis les lipides sont resuspendus dans 10 ml d'eau désionisée stérile par sonication dans un bain. La solution est ensuite soniquée sur la glace à l'aide d'une sonde VibraCell jusqu'à complète clarification (amplitude 100 par pulsations de 30 secondes). Le transfectace est aliquoté et conservé à 4°C.

2.3.3. Transfection au phosphate de calcium (Parker et Stark, 1979)

Les cellules cultivées à confluence sur PP sont cotransfectées par deux plasmides : 5 µg du plasmide codant la G recombinante et 3 µg du plasmide pcDNA1-PGFP qui code une protéine de fusion entre la P du VR et la *green fluorescent protein* (GFP). Les deux plasmides sont incubés 20 minutes à température ambiante dans 125 µl de tampon HBSP en présence de CaCl₂ (9µl d'une solution 2M). Les cellules sont incubées dans ce mélange pendant 30 minutes à température ambiante. On ajoute 1 ml de MEM contenant 5% de serum de veau et les cellules sont placées à l'étuve pendant 4 heures. On procède ensuite à un choc osmotique de 90 secondes dans du PBS contenant 15% de glycérol. Les cellules sont alors remises en culture dans 3ml de MEM contenant 10% de serum de veau. Le milieu est renouvelé environ 16 heures plus tard.

Tampon HBSP :

HEPES-NaOH 21 mM pH 7,1

NaCl	137 mM	Na ₂ HPO ₄	0,7 mM
KCl	5 mM	dextrose	6 mM

2.4. Marquage des protéines au ³⁵S

2.4.1. Marquage bref

20 heures après la transfection, les cellules sont incubées pendant 60 minutes dans un milieu sans cystéine ni méthionine (ICN) et placées dans l'étuve. Après cette phase de carençage, les cellules cultivées sont marquées pendant 5, 10 ou 30 minutes avec 200 µCi de ³⁵S-Promix (APBiotech) dans un volume de 600 µl pour une MP (150 µCi dans 300 µl pour une PP) de milieu carencé préchauffé. A l'issue du marquage, les cellules sont incubées dans du MEM préchauffé, supplémenté en méthionine 5mM et en cystéine 1 mM pour la durée du temps de chasse.

2.4.2. Marquage long (préparation de Gs et de virus radioactifs)

20 heures après la transfection, le milieu de culture est remplacé par un milieu de marquage fait de 10% de MEM et 90% de milieu carencé en méthionine et cystéine. Ce milieu est complété par du ³⁵S-Promix (deux fois 150 µCi pour une PP, à 12 heures d'intervalle).

2.5. Immunofluorescence

Des cellules demi-confluentes transfectées à l'aide de transfectace sont fixées 24 heures après transfection au paraformaldéhyde (4% dans du PBS) à température ambiante, 15 minutes. Les cellules

fixées sont incubées à température ambiante pendant 45 minutes avec l'anticorps souhaité (liquide d'ascite dilué 100 fois dans du PBS). Lorsque c'est indiqué, du Triton X100 a parfois été ajouté à la proportion de 0,1% afin de perméabiliser les cellules. Un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine ou à la rhodamine (dilué 300 fois) a été utilisé pour marquer la protéine G (45 minutes, à l'abri de la lumière). Après d'abondants lavages au PBS, les cellules marquées sont montées sous une lamelle.

2.6. Test de fusion cellulaire

Des cellules confluentes ont été transfectées par la technique au CaCl_2 . Les boîtes dont le tapis cellulaire est en bon état sont sélectionnées pour le test de fusion. Pour chaque plasmide, deux boîtes sont sélectionnées. Dans la boîte test, les cellules sont incubées pendant 15 minutes à 37°C (pas de CO_2), dans du MEM tamponné à pH 5,8 par du MES 50 mM. Dans la boîte témoin, le MEM est seulement renouvelé. Le cas échéant, un choc osmotique de 30 secondes (du PBS dilué 3 fois dans de l'eau) a été pratiqué après l'incubation test. Finalement, les cellules sont de nouveau incubées dans du MEM contenant 10% de serum de veau pour au moins 3 heures afin d'amplifier la redistribution de la GFP dans les syncytia. Les cellules sont enfin fixées au paraformaldéhyde (4% dans du PBS) et recouvertes d'une lamelle.

3. Biochimie

3.1. Tampons

Tampon de lyse des bactéries (purification des peptides P_L et P_S) :

Tris, HCl	50 mM (pH 8)	pepstatine	6 $\mu\text{g/ml}$
chymostatine	6 $\mu\text{g/ml}$	aprotinine	48 $\mu\text{g/ml}$
leupeptine	6 $\mu\text{g/ml}$	Triton X100	0,4 %
antipain	6 $\mu\text{g/ml}$	lysozyme	100 $\mu\text{g/ml}$

Tampon d'élution de la colonne de glutathion (purification des peptides P_L et P_S) :

Tris, HCl	50 mM (pH 8)	glutathion	10 mM
-----------	--------------	------------	-------

Tampon de dilution (TD) :

Tris, HCl	25 mM (pH 7,4)	KCl	5 mM
NaCl	137 mM	Na_2HPO_4	0,7 mM

Tampons de lyse des cellules (TCC ou TCT):

TD	(pH 7,4)		
chymostatine	1 µg/ml		
leupeptine	1 µg/ml		
antipaine	1 µg/ml		
pepstatine	1 µg/ml		
aprotinine	8 µg/ml		
CHAPS	1 % (TCC)	ou	Triton X100 0,5 % (TCT)

Tampons des gradients de saccharose :

tampon de lyse des cellules (TCC ou TCT)	(pH 7,4)		
saccharose	20 %	ou	5 %

Tampon phosphate-citrate (test de sensibilité à l'endo H) :

acide citrique	50 mM (pH 5,6)	Na ₂ HPO ₄	100 mM
----------------	----------------	----------------------------------	--------

TNE glycérol :

Tris, HCl	10 mM (pH 7,5)	EDTA	1 mM
NaCl	150 mM	glycérol	25 %

3.2. Electrophorèses

3.2.1. Tampons d'électrophorèse

Tampon Tris-Glycine :

Tris	25 mM	pH 8,3
Glycine	200 mM	
SDS	0,1 %	

Tampon Tris-Tricine :

Tris	100 mM	pH 8,3
Tricine	100 mM	
SDS	0,1 %	

Tampon de Laemmli :

Tris, HCl	62,5 mM	pH 6,8	
SDS	2 %		β-mercaptoéthanol 5 %
glycérol	10 %		bleu de bromophénol 0,01 %

Tampon de coloration :

acide acétique	10 %	
bleu R250 (0,28g/l dans l'éthanol)	50 %	

Tampon de fixation / décoloration :

acide acétique	10 %	éthanol	20 %
----------------	------	---------	------

3.2.2. Gels de polyacrylamide

Après dénaturation et réduction dans du tampon de Laemmli, les échantillons de protéines ont été analysés par électrophorèse en présence de 0,1 % de SDS (SDS-PAGE). Sauf exception, le tampon de migration utilisé est le tampon Tris-Glycine et les gels d'électrophorèse sont homogènes : 3 % de polyacrylamide pour les gels de concentration (pH 6,8) et 10 ou 18 % de polyacrylamide pour les gels de séparation (pH 8,8). La migration est faite sous une tension de 60 V jusqu'à ce que le colorant de l'échantillon forme une bande, puis la tension est portée à 210 V.

A cause de la taille modeste des peptides P_L et P_S, des gels en gradient continu 10-20 % de polyacrylamide (ReadyGels, Biorad) dans un tampon Tris-Tricine-SDS ont été utilisés pour suivre leur purification. Dans ces conditions, les tensions appliquées sont de 50 V puis 100 V.

Les gels sont colorés au bleu de Coomassie puis décolorés jusqu'à l'obtention d'un contraste satisfaisant. Les gels contenant des échantillons marqués au ³⁵S sont ainsi fixés, puis séchés sur un papier Whatman et placés dans une cassette afin d'être autoradiographiés (environ 12 heures avec des films Fuji).

3.3. Anticorps et immunoprécipitations

Anticorps :

Les anticorps monoclonaux (mAb) dirigés contre la protéine G sont utilisés sous la forme de liquides d'ascite. Ceux-ci sont obtenus par ponction péritonéale à partir de souris auxquelles les cellules productrices ont été injectées dans le péritoine. La spécificité des anticorps a été déterminée par l'intermédiaire de leur spectre de neutralisation parmi un ensemble de VR mutés dans G (**Tab. 1**, p. 74).

Immunoprécipitations :

Une fois écoulé le temps de chasse, les cellules sont lysées à froid dans du tampon de lyse (TCC ou TCT). Les lysats sont centrifugés à 12000 g, 4°C, pendant 5 minutes.

Une fois clarifiés, les lysats sont aliquotés et incubés à 4°C avec du liquide d'ascite (dilué 1/1000 à 1/100 selon le liquide d'ascite) pour une durée de 45 minutes, sous agitation. De la protéine A couplée au sépharose (Sigma) est ajoutée ensuite et l'incubation à 4°C est prolongée de 45 minutes. Les complexes formés avec la protéine A sont centrifugés et lavés 2 fois avec du TCC. Ils sont finalement resuspendus dans du tampon de Laemmli réducteur concentré et les échantillons sont

bouillis pendant 5 minutes avant d'être analysés par SDS-PAGE et autoradiographie.

Test d'oligomérisation :

Les lysats cellulaires (pour une PP : 300 µl sur 500µl) sont chargés sur des gradients 5-20% de saccharose. Les gradients sont centrifugés dans un rotor SW 41 (Beckman) à 35000 rpm pendant 16 heures à 4°C. Chaque gradient est prélevé en commençant par le bas. Chaque fraction a été immunoprécipitée avec le liquide d'ascite 21H8.

3.4. Enzymes et réactifs, protocoles des tests enzymatiques

Antiprotéases : chymostatine, leupeptine, antipaïne, pepstatine, aprotinine (Sigma)

Détergents : CHAPS (Sigma), Triton X100 (Prolabo)

Enzymes : lysozyme (Sigma), thrombine (APbiotech)

 endoglycosidase H (endo H) et phosphatidylinositol-phospholipase C (PI-PLC) (Roche)

Produits peptidiques : méthionine, cystéine, glutathion (Sigma)

Résines : protéine A - sépharose (Sigma) ; glutathion - sépharose (APbiotech)

Test de réactivité vis-à-vis de l'endo H :

Le liquide d'ascite utilisé est 21H8. Les complexes immuns associés à la protéine A sont incubés dans un tampon phosphate-citrate (pH 5,6) contenant 1% de SDS pendant 5 minutes à 95°C. Le supernageant est divisé en deux aliquotes de 30 µl. L'une est traitée par 8mU d'endo H durant la nuit ; l'autre sert de contrôle en l'absence d'endo H. Pour finir, du tampon de Laemmli réducteur est ajouté aux échantillons et ceux-ci sont chauffés 5 minutes à 95°C.

Test de sensibilité à la PI-PLC :

Pour cette expérience, les cellules ont été marquées pendant 30 minutes et ont subi une chasse de 150 minutes. Les cellules sont incubées dans 900 µl de TD contenant 0,5 U de PI-PLC ou non et placées à l'étuve pendant 60 minutes. Le supernageant et un lavage sont poolés. Les cellules sont lysées dans le TCC. Les échantillons ont ensuite été immunoprécipités avec 21H8.

3.5. Purification des peptides P_L et P_S :

Induction de la production des peptides par les bactéries en culture

400 ml de culture à la DO de 0,7 environ sont incubés en présence de 1mM d'isopropylthiogalactoside pendant 3 heures, à 37°C. Les bactéries sont précipitées au culot par

centrifugation (3000g, 15' à 10 °C) dans des Falcon 50. 200 ml de culture sont centrifugés en quatre fois dans chaque tube. Les culots sont conservés à -80°C. 16 de ces culots sont utilisés pour obtenir 8 mg de peptide.

Purification des protéines de fusion avec la GST

Ces culots ont été resuspendus au vortex dans 16 ml de tampon de lyse, incubés à 30°C pendant 30 minutes puis soniqués (appareil VibraCell : pulsations de 2" à l'amplitude 80 pendant 3', avec la sonde de 3 mm de diamètre). La préparation a été clarifiée par centrifugation (15' à 16000g, 4°C) et l'ensemble des surnageants a été mélangé avant d'être déposé sur une colonne d'affinité pour la GST (glutathion immobilisé sur sépharose).

Le gel (APBiotech) a été utilisé à la pression atmosphérique, en chambre froide. 1 ml de gel a été utilisé pour environ 2,5 mg de protéine de fusion avec la GST (déposé en parallèle sur deux colonnes d'affinité pour la GST soit 2 x 6ml de gel). Les colonnes ont alors été traitées selon les spécifications du fabricant et l'éluat a été dialysé contre du Tris 50 mM pH 7,4.

Purification des peptides P_L et P_S

L'échantillon dialysé a été de nouveau partagé équitablement en deux et chaque aliquot a été incubé à 25°C en présence de 250 U de thrombine (env. 30 U par mg de protéine de fusion). La répétition de l'étape d'affinité pour la GST permet de retenir la plus grande partie de la GST ; malgré cela, une colonne d'affinité anionique (MonoQ HR 10/10 - APBiotech) et une nouvelle colonne d'affinité pour la GST sont nécessaires pour obtenir un échantillon dépourvu de contaminant d'après la coloration au bleu de Coomassie.

Les échantillons ainsi préparés ont été dialysés contre le tampon approprié (pH, force ionique) et concentrés sur des Centricon 3 jusqu'à une concentration de 2 mg/ml ou 5 mg/ml, selon l'application à laquelle ils étaient destinés.

4. Biophysique

4.1. Ultracentrifugation analytique à l'équilibre

Ces expériences ont été réalisées par Gérard Batelier, du Laboratoire d'Enzymologie et de Biologie Structurale du CNRS à Gif-sur-Yvette.

Les échantillons de P_L et de P_S ont été préparés à la concentration de 80 µM dans du Tris pH

8, 50 mM ou dans de l'acétate pH 5, 20 mM. L'appareil était une Beckman Optima XL-A équipée d'un rotor An-Ti 60. L'analyse a été réalisée à quatre vitesses : 21000, 28000, 37000, 42000 rpm, à 4°C. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel XL-Aplot (Beckman).

4.2. Dichroïsme circulaire

Ces expériences ont été réalisées sous la direction d'Alain Chaffotte de l'Unité de Biochimie Cellulaire de l'Institut Pasteur à Paris.

Les spectres dichroïques ont été enregistrés par un appareil Jobin Yvon Mark VI de 185 nm à 260 nm, avec un incrément de 0,5 nm, un temps d'intégration de 1 seconde, une bande passante de 2 secondes et l'accumulation de 5 cycles. Le programme VarSelec (Manavalan et Johnson, 1987) a été utilisé pour analyser les données.

La concentration en peptide des échantillons était de 0,65 mg/ml (80 μ M) à pH 8 dans un tampon phosphate, 20 mM et de 0,48 mg/ml (60 μ M) à pH 5 dans un tampon acétate, 20 mM. Les expériences faites en présence de 2,2,2-trifluoéthanol (TFE), ont été réalisées dans une solution de phosphate 20 mM tamponnée à pH 8 ou à pH 5,7.

4.3. Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

Ces expériences ont été réalisées sous la direction de Bruno Robert du SBFM du CEA à Saclay.

Les échantillons ont été dialysés contre du Tris-HCl, pH 8, 50 mM ou de l'acétate, pH 5, 20 mM en présence de 150 mM NaCl ou non. La concentration finale en peptide était de 1,8 mg/ml (220 μ M) et 2 mg/ml (320 μ M) pour P_L et P_S respectivement. Les spectres infrarouge ont été enregistrés en atmosphère azote avec une résolution de 4 cm^{-1} sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Brücker Vector 22. Chaque spectre provient de la somme de 200 interférogrammes.

Les pics amide I (1650 cm^{-1}) et amide II (1540 cm^{-1}) ont été déconvolués en utilisant le programme Grams 32 (Galactic). Les composantes des deux pics ont été déterminées par la méthode de l'autodéconvolution, en supposant que leur nature était gaussienne. La quantification des éléments de structure secondaire a été basée sur la surface des pics élémentaires de l'amide I. Sa précision peut être estimée à +/- 5%. Toutefois, tous les spectres d'un même peptide ayant été déconvolués avec un même jeu de pics élémentaires, l'estimation de l'étendue des réarrangements structuraux régulés par le pH à partir des variations spectroscopiques, peut être considérée comme plus précise.

4.4. Résonance magnétique nucléaire

Ces expériences ont été entièrement mises en oeuvre au Laboratoire de RMN à Haut Champ du CNRS à Gif-sur-Yvette, par Michaël Domanski, sous la direction d'Eric Guittet.

Les peptides ont été préparés dans du tampon phosphate, 20 mM à pH 5,3 à la concentration de 5 mg/ml.

Résultats & Discussion

Chapitre 1

p. 71

Rôle du domaine transmembranaire dans le repliement de l'ectodomaine de G

Chapitre 2

p. 88

Rôle de la région juxtamembranaire dans la flexibilité conformationnelle de G

Chapitre 3

p. 107

Participation du domaine transmembranaire et de la région juxtamembranaire externe à la fusion membranaire

Discussion

p. 117

Chapitre 1

Rôle du domaine transmembranaire dans le repliement de l'ectodomaine de G

Gaudin et al (1999b) ont mis en évidence l'effet déterminant de l'ancrage membranaire sur le repliement de l'ectodomaine de G. Deux protéines tronquées, dépourvues du domaine cytoplasmique (G_{1-461}) ou bien des domaines transmembranaire et cytoplasmique (G_{1-439}), ont été construites à partir de la G du VR (**Fig. 1.1**). En comparant le repliement et la structure de ces deux protéines à celui de la G complète (G_{WT}), Gaudin *et al.* ont constaté que G_{1-461} et G_{1-439} ont une antigénicité différente, celle de G_{1-461} étant semblable à celle de G_{WT} . D'autre part, contrairement à G_{WT} , G_{1-439} est monomérique.

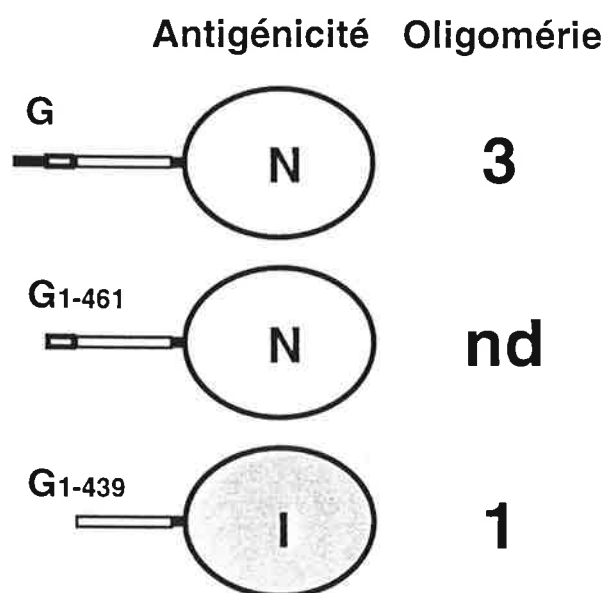


Fig. 1.1 : Rôle de l'ancrage membranaire dans le repliement de l'ectodomaine de G. G_{WT} et G_{1-461} se replient sous la forme native N et G_{1-439} se replie sous une forme alternative qui ne possède ni le site II ni le site III (Gaudin et al., 1999b ; Maillard et Gaudin, résultat non publié).

Le repliement de G a lieu dans le reticulum endoplasmique (RE) sous la forme native N. Elle traverse ensuite les compartiments acides du Golgi sous la forme inactivée I (Gaudin *et al.*, 1995b). N et I sont en équilibre en fonction du pH et G acquiert de nouveau la forme N à la surface de la cellule (Gaudin *et al.*, 1993). En altérant le pH ou en bloquant le trafic intracellulaire, Gaudin *et al.* (1999b) ont vérifié que G_{1-439} se replie directement sous une forme différente de N, peut-être la forme I. Le domaine transmembranaire (DTM) influence donc le repliement de l'ectodomaine de G.

Le rôle de l'ancrage membranaire dans le repliement de l'ectodomaine de G peut être direct ou bien indirect. Nous avons donc étudié une série de protéines chimériques dont l'ancrage à la membrane différait de celui de G_{WT} afin d'identifier les propriétés de l'ancrage qui sont significatives pour le repliement de l'ectodomaine de G.

1. La nature de l'ancrage est-elle importante?

1.1. Conséquences de l'ancrage membranaire

L'ancrage des protéines à la membrane leur confère plusieurs propriétés susceptibles d'influencer leur structure. L'espace de diffusion des chaînes polypeptidiques ancrées à la membrane est réduit à deux dimensions, ce qui a pour effet d'accroître la concentration apparente de la protéine. De plus, les protéines ancrées sont orientées par rapport à la membrane ; dans le cas des protéines oligomériques, l'orientation imposée est nécessairement propice à l'interaction avec les partenaires. Ces deux facteurs modifient les conditions d'oligomérisation et favorisent l'assemblage des protéines oligomériques (**Fig. 1.2**). L'assemblage est à son tour susceptible d'influencer le repliement (pour revue : Shakhnovich, 1999).

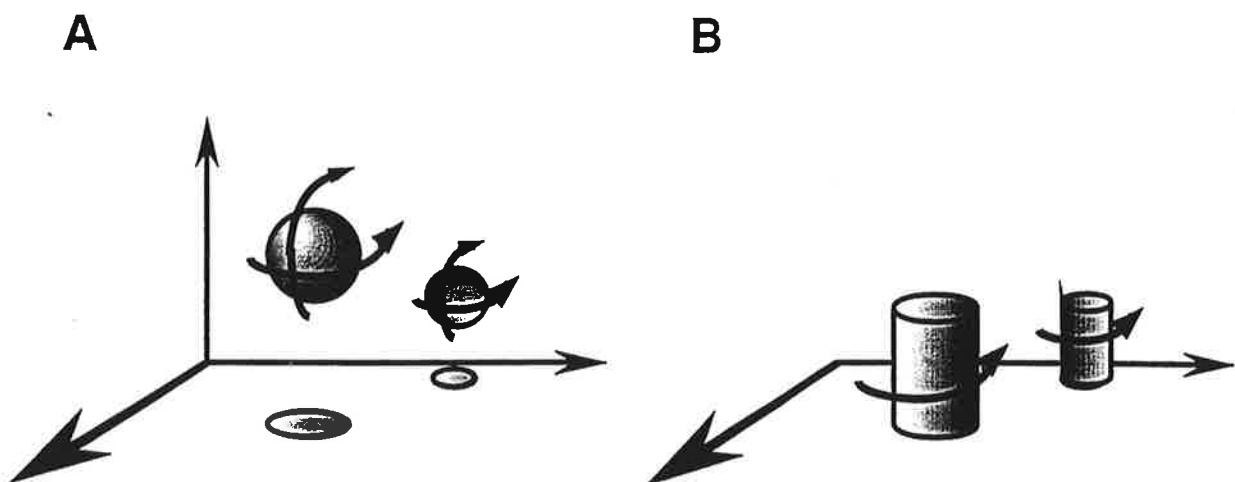


Fig. 1.2 : Conséquences de l'ancrage membranaire sur l'oligomérisation. A. Les objets en solution diffusent et s'orientent librement. B. La diffusion des objets ancrés à la membrane est limitée à la phase membranaire et l'orientation par rapport à la membrane est choisie.

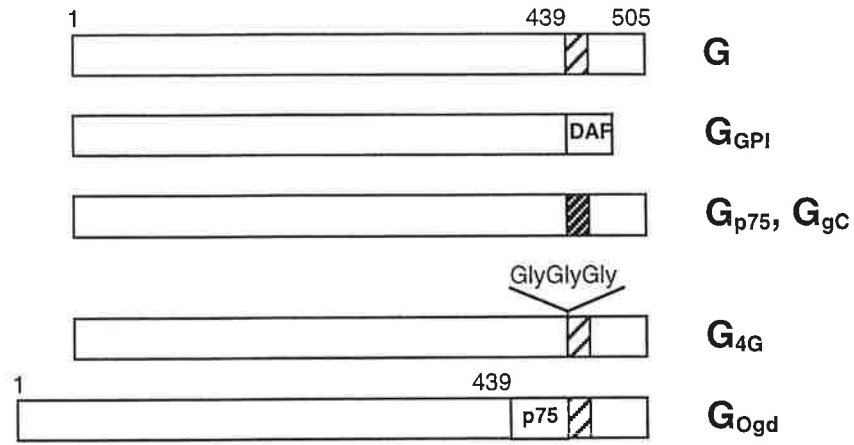
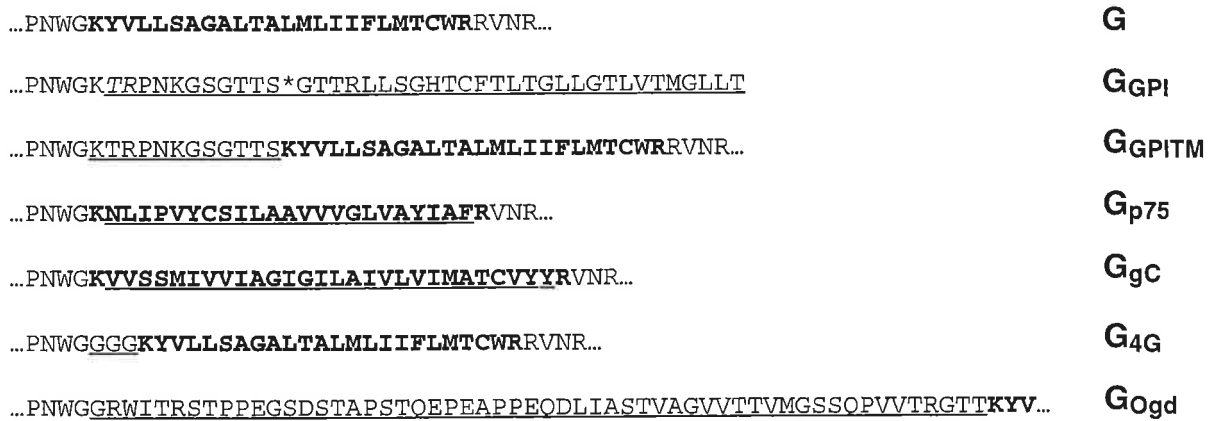
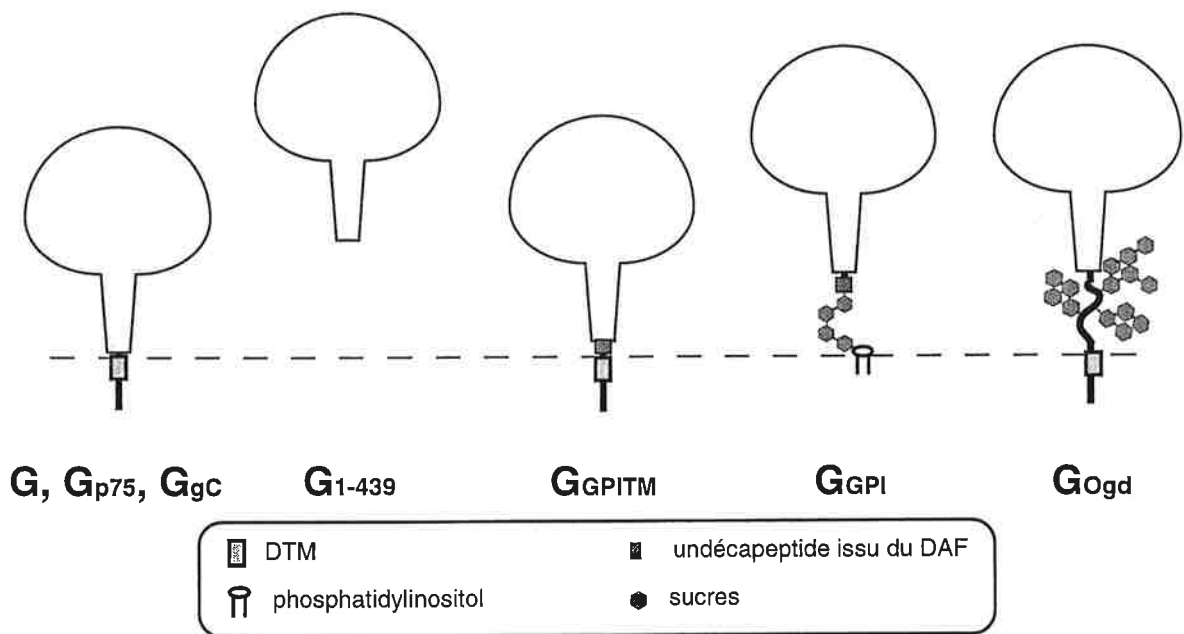
A**B****C**

Fig. 1.3 : (Légende page suivante)

Fig. 1.3 : Séquence et représentation schématique des différentes protéines G mutantes du chapitre 1.

A. Représentation en briques. Le peptide signal a été omis. G est la glycoprotéine du virus rabique (souche PV). DAF : Decay Accelerating Factor. gC : glycoprotéine C du virus de la pseudorange. Ogd : domaine O-glycosylé de la p75 humaine long de 56 résidus, riche en Ser / Thr. **B.** Séquence des constructions. La séquence des DTM est en gras et celle des modifications est soulignée. Dans la séquence de G_{GPI} , l'astérisque signale le point de transfert sur l'ancre glypiée et les deux résidus en italique correspondent au site de restriction de *Mlu I*. **C.** Représentation de l'insertion membranaire des différentes protéines. Les pointillés symbolisent la limite extracellulaire de la membrane.

La restriction de l'orientation d'une protéine dépend probablement du moyen d'ancrage utilisé, mais on suppose que, comme la restriction de la diffusion, elle est essentiellement préservée dans le cas d'un ancrage non peptidique, en particulier dans le cas d'un ancrage glycolipidique.

1.2. Substitution d'une ancre GPI au DTM.

Le DTM a été remplacé par l'ancre glycoposphatidylinositol (GPI) du *Decay Accelerating Factor*. Dans la chimère G_{GPI} que nous avons construite, l'ectodomaine est lié à un glycolipide qui l'ancre dans la membrane (**Fig. 1.3**). Ce moyen d'ancrage est acquis par suite de la maturation d'un propeptide carboxyterminal.

La susceptibilité de G_{GPI} à la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC) a été vérifiée en soumettant des cellules préalablement marquées produisant la G_{GPI} à l'action de l'enzyme. Les surnageants ont finalement été immunoprécipités avec 21H8, un anticorps monoclonal qui reconnaît les différentes conformations de G (**Tab. 1**). La détection de l'ectodomaine de G dans le surnageant après traitement à la PI-PLC confirme la nature de l'ancrage GPI ainsi que l'acheminement de G_{GPI} à la surface cellulaire (**Fig. 1.4.A**). La maturation des glycanes a été suivie en analysant la cinétique de l'acquisition de la résistance à l'endoglycosidase H (endo H) : la résistance est détectée après 40 minutes de chasse (**Fig. 1.4.B**) ce qui est comparable au sort de G_{WT} et de G_{1-439} (Gaudin *et al.*, 1999b). L'accumulation de G_{GPI} à la surface des cellules transfectées a aussi été mise en évidence par immunofluorescence (**Fig. 1.9**, p. 83).

La structure tertiaire de l'ectodomaine de G_{GPI} a été comparée à celle de G_{1-439} et de G_{WT} au moyen d'anticorps monoclonaux sélectionnés (**Tab. 1**). Il apparaît clairement que les anticorps conformationnels du panel constitué permettent de distinguer les profils de G_{1-439} et de G_{GPI} , qui sont

identiques, de celui de G_{WT} qui est reconnue par tous les anticorps (**Fig. 1.4.C**). Le même résultat a été obtenu en immunofluorescence, ce qui montre que l'absence de reconnaissance par les anticorps 30AA5 et 41BC2 ne résulte pas de la solubilisation de G_{GPI} par le CHAPS (**Fig. 1.9**, p. 83). D'une manière générale, les résultats des immunoprécipitations et de l'immunofluorescence de surface des cellules transfectées ont été trouvés concordants (**Fig. 1.9**).

Enfin, la structure quaternaire de G_{GPI} a été comparée à celles de G_{WT} et de G_{1-439} . Des lysats de cellules produisant une des trois protéines recombinantes ont été déposés sur des gradients linéaires 5-20% de saccharose et centrifugés. Les douze fractions récoltées ont été immunoprécipitées avec l'anticorps 21H8. Ces expériences ont été réalisées en présence de 1% de CHAPS, conditions dans lesquelles le trimère de G_{WT} est préservé (Gaudin *et al.*, 1992). Une préparation dans 0,5% de Triton X100 a été utilisée comme contrôle de la position du monomère de G. La migration de G_{GPI} est similaire à celle de G_{WT} dans le Triton, ce qui indique qu'elle est monomérique (**Fig. 1.8**, p. 82).

Les caractéristiques structurales de G_{GPI} sont différentes de celles de G_{WT} et identiques à celles de G_{1-439} . Ces résultats montrent que la restriction de la diffusion et de l'orientation de la protéine G (plus difficile à évaluer) ne suffisent pas à expliquer l'effet du DTM sur le repliement de G.

Tab. 1 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés pour caractériser la conformation de G.

Anticorps	Epitope	G dénaturée ^a	Reconnaissance de :			
			Forme native de G (N)		Forme inactive de G (I)	
			sur le virus	après solubilisation	sur le virus	après solubilisation
21H8 ^b	?	+	-	+	+	+
30AA5 ^c	Site II	-	+	+	-	-
40DC2 ^b	Site II	-	+	+	-	-
41BC2 ^b	Site III	-	+	+	+/-	-
18B5 ^d	Site III	-	+	+	+/-	-
9B4 ^b	Site a	-	+	+	+	+
17D2 ^e	255-270	+	+/-	+	-	-

^a d'après un Western blot après SDS-PAGE. ^b Raux, Flamand and Gaudin : résultats non publiés. ^c Caractérisation dans Préhaud *et al.* (1988) et Gaudin *et al.* (1993, 1995, 1997, 1999b). ^d Caractérisation dans Gaudin (1997). ^e Caractérisation dans Lafay *et al.* (1996), Gaudin *et al.* (1997, 1999b).

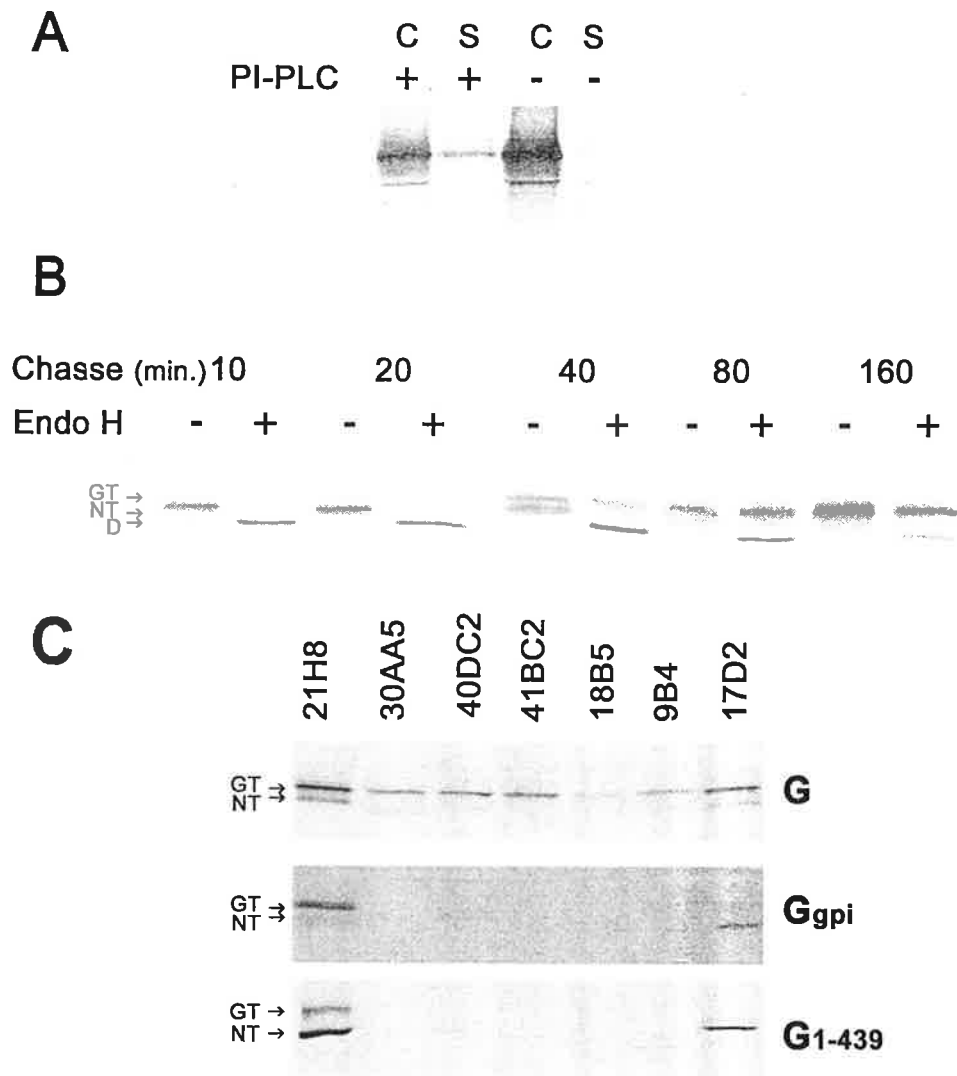


Fig.-1.4 : Caractérisation de G_{GPi}. **A.** Sensibilité à la PI-PLC. Après 10 minutes de marquage et 60 minutes de chasse, les cellules transfectées ont été recouvertes avec du tampon TD contenant de la PI-PLC (+) ou non (-). 60 minutes plus tard, les surnageants (S) ont été prélevés et les cellules (C) ont été lysées à froid dans du TD contenant 1% de CHAPS. Les échantillons ont ensuite été immunoprécipités avec l'anticorps 21H8 et analysés par SDS-PAGE (10% de polyacrylamide) en conditions réductrices. **B.** Cinétique d'acquisition de la résistance à l'endo H. Les cellules ont été lysées après un marquage de 10 minutes et une chasse de la durée indiquée. Les lysats ont été immunoprécipités avec 21H8 et les échantillons ainsi préparés ont été incubés en présence (+) ou en absence (-) d'endoH. G_{GPi} est synthétisée sous la forme *NT*, glycosylée et non maturée. L'endo H transforme NT en *D*, forme déglycosylée. La maturation des sucres par des enzymes du réseau de Golgi transforme NT en *GT*, qui est résistante à l'endoH. **C.** Antigénicité comparée de G_{WT}, G_{GPi} et G₁₋₄₃₉. Après 10 minutes de marquage et 60 minutes de chasse, les cellules ont été lysées à froid dans du TD contenant 1% de CHAPS. Le lysat a été aliquoté et chaque fraction a été immunoprécipitée avec l'anticorps spécifié. Les échantillons ont été analysés en SDS-PAGE après dénaturation dans un tampon réducteur. NT : produit non maturé. GT : produit maturé.

2. L'ancrage TM participe-t-il à l'oligomérisation de G?

2.1. Propriétés structurales du DTM

Dans certains cas, la structure du DTM participe directement à l'assemblage de protéines transmembranaires oligomériques (Asundi et Carey, 1995 ; MacKenzie *et al.*, 1997 ; Patricelli *et al.*, 1998 ; Constantinescu *et al.*, 1999). Les DTM adoptant une conformation hélicoïdale, leur assemblage résulte en une structure semblable à un coiled-coil. Cette interaction semble en effet être commandée par des critères de complémentarité stérique ("tenon et mortaise") entre les chaînes latérales qui se font face sur les DTM destinés à interagir (Langosh et Heringa, 1998).

2.2. Remplacement du DTM de la G du VR par un DTM étranger

L'ancrage TM participe-t-il à la structure quaternaire de G? Pour répondre à cette question, deux protéines chimériques dans lesquelles le DTM d'origine a été remplacé par celui de deux protéines transmembranaires de type I sans rapport entre elles ni avec G, ont été construites. Ceci nous a aussi permis de savoir si le rôle du DTM dans le repliement de l'ectodomaine de G est spécifique ou non.

La chimère **G_{p75}** possède les 20 résidus du DTM du récepteur humain de basse affinité au facteur de croissance des cellules nerveuses (p75). p75 appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosyl-kinase ; par analogie, cette protéine est considérée comme monomérique à l'état inactif et comme oligomérique en présence de ligand (pour revue : Yano et Chao, 2000). La chimère **G_{gC}** possède les résidus du DTM de la glycoprotéine C (gC) du virus de la pseudorange, un herpèsvirus porcine. La structure quaternaire de gC n'est pas trimérique (Hampl *et al.*, 1984 ; Zhu et Courtney, 1988). D'après la littérature, les DTM de p75 et de gC ne sont pas des domaines de trimérisation.

La structure tertiaire de l'ectodomaine de ces chimères a été examinée à l'aide de deux anticorps représentatifs de l'antigénicité de G : 30AA5 et 41BC2, respectivement sensibles à la conformation des sites II et III, et de 21H8 dont l'épitope est à l'extérieur des sites antigéniques de G

(**Tab. 1**). Deux bandes sont précipitées par 21H8. La bande légère est le précurseur de la bande la plus lourde qui résulte de la maturation des sucres dans l'appareil de Golgi, comme en témoigne sa résistance à l'endo H (non montré). La reconnaissance de G_{p75} et de G_{gC} par les anticorps 30AA5 et 41BC2 indique que leur ectodomaine se replie comme celui de G_{WT}

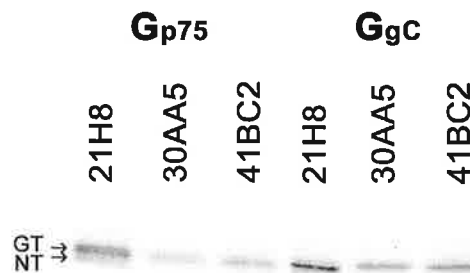


Fig. 1.5 : Antigénicité des chimères Gp75 et GgC. Après 10 minutes de marquage et 60 minutes de chasse, les cellules ont été lysées à froid dans du TD contenant 1% de CHAPS. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps indiqués. Analyse en SDS-PAGE réductrice. NT : protéine non maturée. GT : protéine maturée.

La structure quaternaire de G_{p75} et de G_{gC} a été testée de la même façon que celle de G_{GPI}. Il en ressort que ces deux protéines, bien que correctement repliées sous la forme native, diffèrent par la stabilité des oligomères formés. Alors que la migration de G_{gC} est comparable à celle de G_{WT} et est donc trimérique, G_{p75} se comporte comme un monomère (**Fig. 1.8**, p. 82).

Sur la base de ces résultats, nous avons déduit que l'ancrage par un DTM est suffisant pour permettre à l'ectodomaine d'acquérir la même antigénicité que dans son état natif. La diversité des trois DTM testés permet d'ajouter que l'effet du DTM résulte vraisemblablement, d'une propriété commune à la plupart, sinon à tous les DTM.

3. Le domaine TM est-il un noyau de repliement?

3.1. Nucléation d'une hélice dans la phase lipidique

Les conditions particulières de la phase lipidique favorisent la conformation du DTM en hélice. L'hélice permet en effet aux groupes CO et NH du squelette peptidique d'établir des liaisons hydrogène

entre eux donc de soustraire leurs groupes hydrophiles à un environnement hydrophobe. Il est possible qu'une hélice formée dans la membrane recrute des résidus en-dehors de la membrane et se propage dans la région juxtamembranaire. Le DTM jouerait alors un rôle structural direct en étant le site de nucléation d'une hélice. Ce rôle expliquerait qu'un ancrage peptidique, quelqu'il soit, serait nécessaire et suffisant, alors qu'un ancrage GPI serait inapproprié.

Le problème a été abordé de deux manières : 1) le DTM a été remplacé par le noyau d'un coiled-coil pour donner un ectodomaine soluble trimérique G_{iiGCN4} ; 2) un briseur d'hélices a été inséré entre le DTM et l'ectodomaine de G_{WT} .

3.2. Remplacement du DTM par un coiled-coil trimérique.

L'approche consistant à produire une forme soluble en remplaçant le domaine transmembranaire par un coiled-coil a déjà été utilisée avec succès dans le cas de gp160, protéine d'enveloppe du VIH (Yang *et al.*, 2000). Dans ce cas, la protéine elle-même est construite autour d'un coiled-coil trimérique qui prolonge le DTM (Weissenhorn *et al.*, 1997). Bien que rien de tel ne soit suspecté dans le cas de la G du VR, son DTM a été remplacé par un coiled-coil trimérique afin de mettre en évidence la contribution structurale éventuelle d'une hélice nucléée dans le DTM.

L'assemblage d'un coiled-coil procède par nucléation - extension (Kammerer *et al.*, 1998) : c'est pourquoi le noyau d'un coiled-coil trimérique a été greffé en lieu et place du DTM. Le domaine trimérique choisi est dérivé par ingénierie du coiled-coil de la protéine GCN4 de la levure de bière (Harbury *et al.*, 1993). Quatre domaines différant par un résidu de plus ou de moins ont été substitués au DTM afin d'envisager toutes les orientations possibles de l'ectodomaine par rapport à la surface d'interaction du domaine coiled-coil. Les quatre protéines chimères sont G_{iiGCN4} *a, b, c, d* (**Fig. 1.6.A**).

Les protéines chimères immunoprécipitées par 21H8 sont des chaînes qui n'ont pas quitté le RE, comme en témoigne l'absence de chaîne aux sucres complexes (**Fig. 1.6.B**). L'immunoprécipitation d'une quantité de protéine dans le surnageant des cellules est peut-être la conséquence de fuites du système de contrôle-qualité ou de lyse cellulaire. En l'absence de signal de rétention pour ce compartiment, la conclusion est qu'aucune des chimères n'est repliée, ce que confirme d'ailleurs l'absence d'immunoprécipitation par l'un ou l'autre des anticorps conformationnels. La connection d'un domaine coiled-coil à G_{1-439} en compromet donc le repliement ; l'absence de repliement n'autorisant

aucune conclusion, il nous fallait procéder autrement.

A

a: DEAE~~D~~FVEVHLPDVHERISGVDLGLPNWGK-MKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGE
b: DEAE~~D~~FVEVHLPDVHERISGVDLGLPNWGK-KQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGE
c: DEAE~~D~~FVEVHLPDVHERISGVDLGLPNWGK-QIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGE
d: DEAE~~D~~FVEVHLPDVHERISGVDLGLPNWGK-IEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGE

B



Fig. 1.6 : Caractéristiques des chimères GiiGCN4. **A.** Séquence de la région carboxyterminale des chimères GiiGCN4a, GiiGCN4b, GiiGCN4c et GiiGCN4d. Le tiret marque le début de la séquence GCN4. Les positions clés du motif coiled-coil sont soulignées. **B.** Antigénicité des chimères GiiGCN4. Après 10 minutes de marquage et 60 minutes de chasse, les cellules ont été lysées à froid dans du TD contenant 1% de CHAPS. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps indiqués. Analyse en SDS-PAGE (10% de polyacrylamide) après dénaturation dans un tampon réducteur. NT : protéine non maturée.

3.3. Insertion d'un briseur d'hélices en amont du DTM.

La structure d'une hélice α est caractérisée par l'enchaînement périodique de certains angles de torsion au niveau des liaisons du squelette peptidique. Du fait de leur faible propension à satisfaire ces contraintes, certains résidus se comportent le plus souvent comme des briseurs d'hélices. Les résidus prolyl et glycyll sont classiquement considérés comme des briseurs d'hélice bien qu'ils soient rencontrés dans certaines hélices où ils remplissent souvent une fonction particulière (pour exemples : Brosig et Langosch, 1998 ; Suh *et al.*, 1999). Dans le but de stopper la propagation d'une hélice formée dans le DTM, 4 glycyll consécutifs ont été réunis dans la partie carboxyterminale de l'ectodomaine (**Fig. 1.3.A**). Une telle séquence paraît suffisante pour relâcher toutes les contraintes assurant la

conformation hélicoïdale.

L'antigénicité de **G_{4G}** est semblable à celle de **G_{WT}** (**Fig. 1.7.A**) ce qui montre qu'un espaceur flexible de petite taille préserve l'effet du DTM sur le repliement de l'ectodomaine de G. L'hypothèse de la propagation de l'hélice du DTM dans l'ectodomaine est donc fautive. L'analyse de la structure oligomérique de **G_{4G}** sur gradient de saccharose a révélé peu ou pas de trimère, comme dans le cas de **G_{p75}**. Cela signifie que l'insertion du tripeptide Gly₃ amoindrit la stabilité du trimère de **G_{WT}** (**Fig. 1.8, p. 82**).

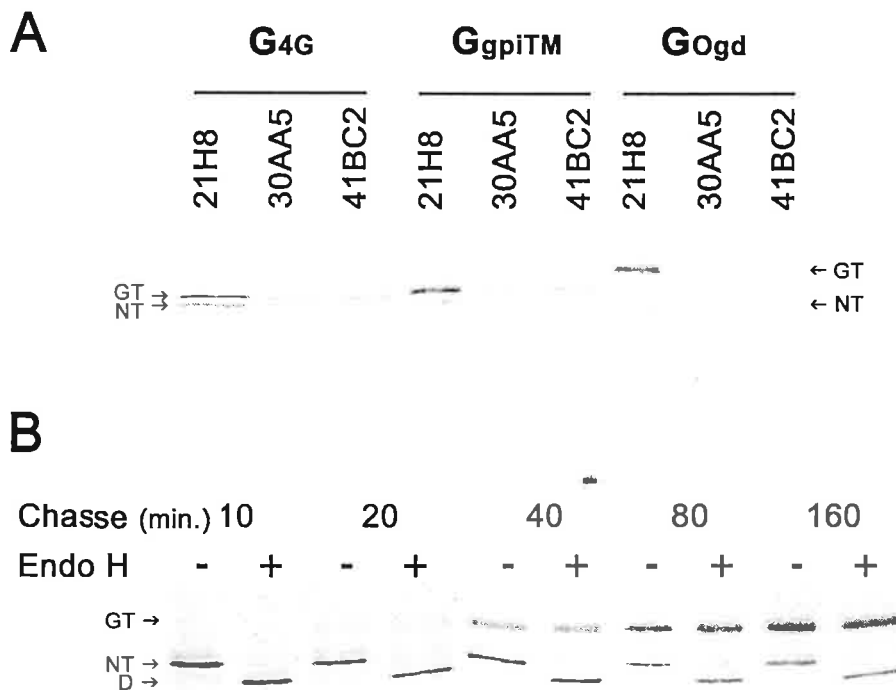


Fig. 1.7 : Insertion d'un oligopeptide entre l'ectodomaine et le DTM. A. Antigénicité de **G_{4G}**, de **G_{GPITM}** et de **G_{Ogd}**. Après 10 minutes de marquage et 60 minutes de chasse, les cellules ont été lysées à froid dans du TD contenant 1% de CHAPS. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps indiqués. NT : protéine non maturée. GT : protéine maturée. **B.** Cinétique d'acquisition de la résistance à l'endo H par **G_{Ogd}**. Les cellules ont été lysées après un marquage de 10 minutes et une chasse de la durée indiquée. Les lysats ont été immunoprécipités avec 21H8 et les échantillons ainsi préparés ont été incubés en présence (+) ou en absence (-) d'endoH. D : **G_{Ogd}** déglycosylée. NT : **G_{Ogd}** non maturée. GT : **G_{Ogd}** maturée. Analyses par SDS-PAGE en conditions réductrices.

4. Rôle indirect du DTM dans le repliement de G

L'effet du DTM sur le repliement de l'ectodomaine de G est indépendant de la séquence du DTM, et ne semble pas lié à la nucléation d'une hélice. L'ensemble de ces résultats indique donc que le rôle du DTM est indépendant de sa structure. Néanmoins, une ancre GPI ne peut pas lui être substituée. Après avoir envisagé la question de l'influence du DTM sur le repliement de l'ectodomaine de façon rationnelle, nous avons entrepris une approche mimétique en tâchant de reproduire tout ou partie des caractéristiques d'un ancrage GPI.

4.1 Insertion de l'oligopeptide de l'ancre GPI

L'ectodomaine de G_{GPI} est lié à l'acide phosphatidylinositol par un oligopeptide et un oligosaccharide (**Fig. 1.3**). Nous avons donc construit G_{GPI}^{DTM} en raccordant directement l'ectodomaine de G_{GPI} (oligopeptide compris) au DTM de G_{WT} (**Fig.1.3.B**). Cette construction se replie convenablement et son antigénicité a été trouvée semblable à celle de G_{WT} (**Fig. 1.7.A**). L'insertion de l'oligopeptide n'a pas d'effet sensible sur le repliement de l'ectodomaine et ne suffit donc pas à reproduire l'effet d'un ancrage GPI.

4.2 Insertion d'un espaceur peu structuré de grande taille

Le dernier caractère de G_{GPI} à tester est la présence de l'oligosaccharide liant l'ectodomaine à l'acide phosphatidylinositol. Il est actuellement impossible de construire une protéine possédant à la fois un DTM et un oligosaccharide de liaison entre l'ancre transmembranaire et l'ectodomaine. Mais il est possible de mimer cette situation en insérant un espaceur peptidique peu structuré de taille suffisante.

Les domaines O-glycosylés satisfont ce critère (van den Steen *et al.*, 1998). La protéine G_{Ogd} a été construite par insertion du domaine O-glycosylé de p75 entre le DTM et l'ectodomaine (**Fig. 1.3**). Cette nouvelle chimère gagne l'appareil de Golgi avec la même cinétique que G_{WT} ce qui est le signe d'un repliement correct (**Fig. 1.7.B**), mais elle n'est pas reconnue par les anticorps 30AA5 et 41BC2

(Fig. 1.7.A). Enfin G_{Ogd} est monomérique d'après sa migration à travers un gradient linéaire 5-20 % de saccharose (Fig. 1.8). Comme G_{GPI}, et bien qu'ancrée à la membrane par un DTM, G_{Ogd} se replie donc sous une forme alternative.

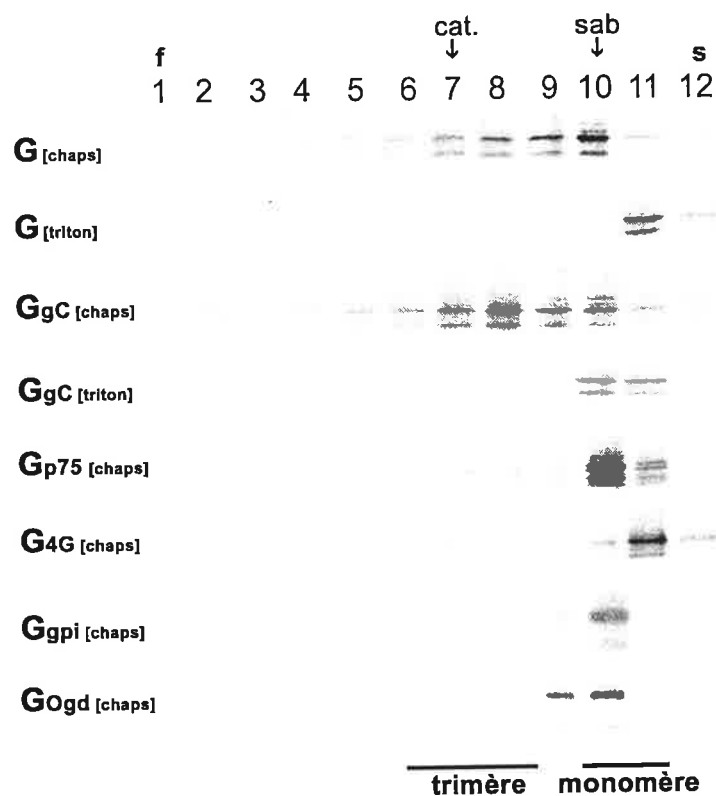


Fig. 1.8 : Analyse de l'état oligomérique des différentes chimères présentée dans cette étude par migration à travers un gradient linéaire 5-20 % de saccharose. Les cellules marquées ont été lysées dans le même tampon que celui du gradient utilisé pour l'analyse : TD contenant 1 % de CHAPS ou 0,5 % de Triton X100. Les fractions (1-12) ont été récoltées depuis le fond du gradient (f) jusqu'à sa surface (s). La migration des trimères et des monomères de G est indiquée par G[chaps] et G[triton] respectivement (Gaudin *et al.*, 1992). La position des marqueurs catalase (cat) et serumalbumine de boeuf (sab) est indiquée.

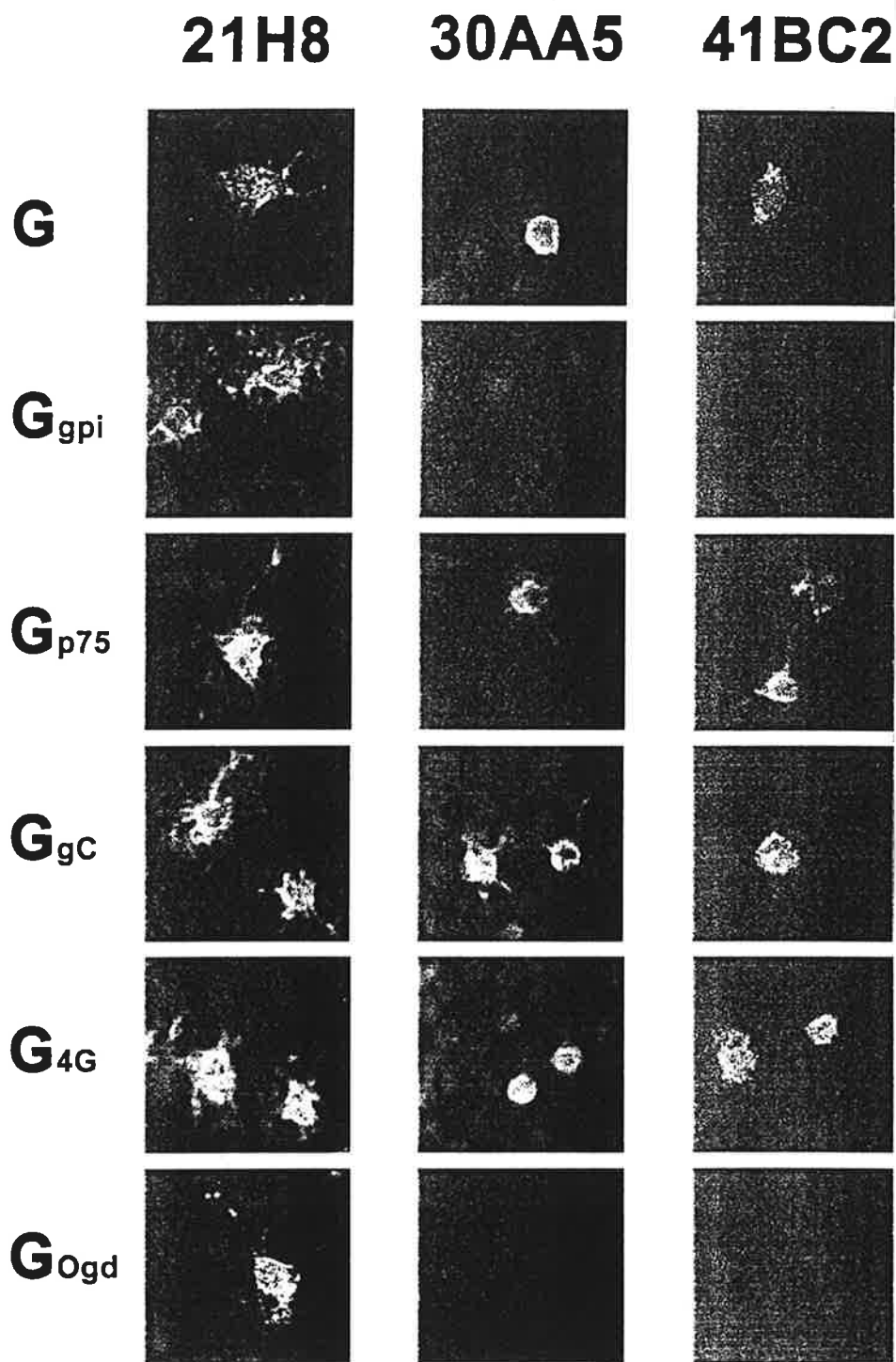


Fig. 1.9 : Immunofluorescence de surface. Les cellules ont été fixées 24 heures après transfection (méthode transfectace), puis incubées successivement avec l'anticorps indiqué et un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (21H8 et 30AA5) ou la rhodamine (41BC2).

5. Conclusion.

Nous avons démontré que l'ectodomaine de G peut se replier alternativement sous plusieurs conformations. La preuve d'un repliement correct est apportée par la tolérance du système de contrôle-qualité du RE, qui a laissé les protéines testées parvenir à la surface (pour revue : Ellgaard *et al.*, 1999). Ces conformations ont été définies sur la base de leur antigénicité, les sites antigéniques majeurs étant caractéristiques de la forme native. Nous avons aussi montré que la conformation alternative sous laquelle se replie G_{1-439} , G_{GPI} et G_{Ogd} se distingue de la forme inactive (Gaudin *et al.*, 1993), par l'absence du site antigénique *a* (anticorps 9B4 ; **Fig. 1.4** ; non montré pour G_{Ogd}) mais lui ressemble par l'absence des sites antigéniques II et III.

Les résultats présentés illustrent la possibilité pour une chaîne polypeptidique d'adopter **plusieurs conformations** (N et I*) qui seront tolérées par le système de contrôle-qualité du RE. Ces différentes conformations sont donc correctement repliées. La forme native d'une protéine a longtemps été considérée comme unique, même si de légères modifications de l'antigénicité avaient déjà été détectées dans des protéines mutantes capables de quitter le RE (Roth *et al.*, 1986 ; Paterson *et al.*, 1989 ; Sodora *et al.*, 1991). L'ectodomaine de la protéine G offre une illustration claire que la "qualité du repliement" évaluée par ce système repose sur des critères généraux, que des formes différentes d'une même protéine sont capables de satisfaire.

Dans le cas de G, la nature de l'ancrage membranaire est à l'origine du repliement alternatif (Gaudin *et al.*, 1999b). Le fait que G_{p75} et G_{gC} se replient comme G_{WT} signifie que la contribution du DTM au repliement de l'ectodomaine de G n'est pas spécifique. Elle ne consiste pas non plus en la nucléation d'une hélice, parce que des espaceurs flexibles et courts, insérés entre le DTM et l'ectodomaine, n'interfèrent pas avec l'effet étudié. Finalement, le fait que G_{GPI} et G_{Ogd} se comportent de la même façon, alors que leur ectodomaine est ancré à la membrane et en est éloigné (**Fig. 1.3.C**), permet de suggérer que le repliement de l'ectodomaine est influencé par la proximité de la membrane. Il découle de cette hypothèse que le rôle du DTM dans le repliement serait d'assurer la proximité de la membrane.

L'influence de la **proximité membranaire** sur l'antigénicité de l'ectodomaine indique que l'environnement membranaire participe à son repliement. Cette participation pourrait être le fait de facteurs situés à proximité de la membrane ou bien de la membrane elle-même. On pourrait imaginer que dans le cas d'une protéine ayant naturellement une forte propension à adopter des structures distinctes, les chaperons seraient capables d'orienter le repliement en jouant leur rôle classique de protection vis-à-vis de certains types d'interaction. Les données disponibles permettent de discuter cette hypothèse. Margolese *et al.* (1993) ont rapporté une abolition de l'interaction avec la CNX par la substitution du DTM du CMH de classe I par un GPI ; il en va différemment de G puisque G_{1-439} , G_{GPI} et G_{WT} interagissent toutes les trois avec la CNX et pas ou peu avec la CRT. D'autre part, G_{1-439} et G_{WT} interagissent avec BiP. L'hypothèse d'une discrimination par des chaperons, voisins de la surface membranaire ou non, n'explique donc peut-être pas la différence de conformation entre G_{1-439} et G_{GPI} d'une part et G_{WT} d'autre part.

Une interaction directe de l'ectodomaine avec la membrane pourrait donc influencer le repliement de G. Il est intéressant de remarquer qu'une interaction directe entre l'ectodomaine et la membrane a déjà été suggérée dans le cas de la G du VSV. Rolls *et al.* (1994) avaient montré que cette protéine est impliquée dans le bourgeonnement membranaire, et Robison et Whitt (2000) ont attribué cette propriété aux douze résidus de l'ectodomaine en amont du DTM. L'hypothèse la plus probable est qu'une interaction directe de ces résidus avec la membrane permettrait de modifier localement la composition lipidique et / ou le rayon de courbure de la membrane. Rolls *et al.* (1994) avaient constaté que la G du VR se comporte comme celle du VSV quoiqu'avec une efficacité cent fois moindre. L'hypothèse d'une participation de la membrane au repliement de l'ectodomaine de la G du VR (et probablement celle du VSV) s'en trouve donc renforcée.

L'effet de la distance entre la membrane et l'ectodomaine sur le repliement de celui-ci pourra être caractérisé de façon plus précise en construisant des domaines hydrophiles dérivés du domaine Ogd par délétion, de manière à obtenir une échelle de tailles.

La nature même de l'effet de la membrane sur le repliement de l'ectodomaine n'est pas clairement établie. Cet effet résulte-t-il d'une interaction transitoire ou permanente entre l'ectodomaine et la membrane? Pour les raisons présentées plus haut, il est probable que la contribution de la membrane au repliement de l'ectodomaine soit d'origine lipidique et non protéique. Si tel est bien le cas, des lipides particuliers de la membrane sont-ils en cause? Une discussion plus approfondie de ces

questions sera faite au terme de ce manuscrit, afin d'y intégrer les observations rapportées dans les chapitres 2 et 3.

Les travaux de Rolls *et al.* (1994) suggèrent que la G du VR et celle du VSV pourraient se comporter de façon similaire. Les résultats obtenus avec les deux protéines diffèrent cependant, ce qui reflète la différence des deux objets mais peut-être aussi la disparité des techniques utilisées d'une étude à l'autre. Ainsi Crise *et al.* (1989) ont construit des protéines semblables à G₁₋₄₃₉ et à G_{GPI} à partir de la G du VSV. Dans le cas du VSV, la protéine sécrétée est conforme à la protéine complète et des expériences de pontage chimique ont montré qu'elle est trimérique. En revanche, la protéine correspondante du VR a été trouvée monomérique par sédimentation à travers un gradient de saccharose (Gaudin *et al.*, 1999b). Ceci pourrait traduire une stabilité moindre des trimères de la G du VR. Il ressort de tout cela que les interactions stabilisant la structure quaternaire de G impliqueraient l'ectodomaine et qu'elles pourraient être renforcées par le domaine transmembranaire.

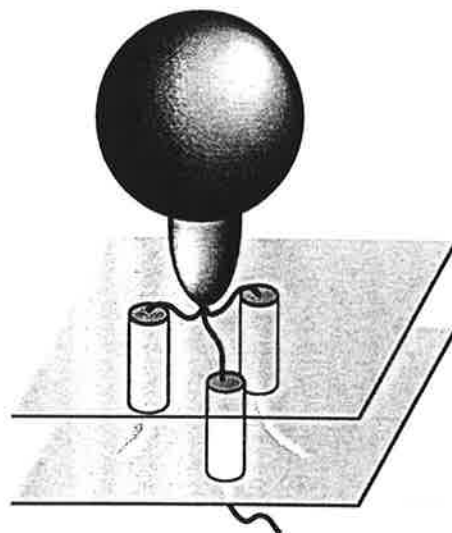
Alors que le DTM de certaines protéines joue un rôle essentiel dans le processus d'oligomérisation (McKenzie *et al.*, 1997 ; Patricelli *et al.*, 1998 ; Ashman et Miller ; 1999), nos résultats montrent que l'oligomérisation de G ne dépend pas spécifiquement de son DTM. En effet, la structure quaternaire de G n'est pas modifiée à la suite du remplacement du DTM de G_{WT} par celui de la protéine gC du PrV -qui n'est pas trimérique. Il est même remarquable que la chimère G_{gC} se comporte comme G_{WT} à la fois dans le CHAPS et dans le Triton X100 (**Fig. 1.8**). Ceci permet de suggérer que le domaine d'oligomérisation est situé dans l'ectodomaine, conformément aux résultats que Crise *et al.* (1989) ont obtenus avec la G du VSV. En revanche, la moindre stabilité des oligomères de G_{p75} en gradient de saccharose indique que, sans en être le déterminant majeur, le DTM est susceptible de contribuer à l'oligomérisation de G (**Fig. 1.8**). La compétence d'un DTM vis-à-vis de l'oligomérisation de G pourrait dépendre de sa capacité à interagir avec certains lipides et non pas, comme c'est parfois le cas, de sa capacité à s'oligomériser (pour revue : Booth et Curran, 1999). Dans ce cadre, l'effet des détergents sur l'état oligomérique de G pourrait s'expliquer par leur aptitude ou leur inaptitude à préserver l'interaction de certains lipides avec G.

L'échec du repliement des chimères G_{iiGCN4}, alors que le simple éloignement de la membrane entraîne un repliement alternatif, peut être expliqué d'au moins deux manières. Premièrement, il est possible que le coiled-coil du domaine iiGCN4 se propage dans la région juxtamembranaire et

compromette le repliement de la protéine en interférant avec celui de cette région. Toutefois l'insertion de 3 Gly à la suite de Gly₄₃₈ dans les quatre protéines G_{iiGCN4} ne leur permet pas de se replier (non montré ; G_{4G-iiGCN4}). Cela permet de suggérer que le repliement n'est pas compromis à cause de la propagation du coiled-coil dans la région juxtamembranaire.

Deuxièmement, la présence du domaine iiGCN4 a pour effet de rapprocher de force les extrémités carboxyterminales de l'ectodomaine, du fait de l'oligomérisation de la région correspondante. Si telle était la cause du défaut de repliement des chimères G_{iiGCN4}, l'échec du repliement des chimères G_{4G-iiGCN4} indique que la contrainte spatiale apportée par le domaine iiGCN4 ne pourrait pas être relâchée par l'insertion de trois résidus. Ceci permet de supposer que les DTM des protomères de G ne sont pas associés dans la membrane. La construction d'un modèle tige - tête (Gaudin *et al.*, 1992) suppose alors que les chaînes polypeptidiques jouxtant le DTM se rapprochent avant d'édifier la tige. La région juxtamembranaire, entre le DTM et la tige pourrait interagir avec la membrane (**Fig. 1.10**).

Fig. 1.10 : Proposition d'une représentation de la protéine G. Le modèle tige-tête est respecté mais les résidus formant la tige n'émergent pas directement de la membrane comme cela est implicitement proposé par la représentation classique d'un modèle tige-tête.



Pour finir, en introduisant le rôle de la membrane dans l'acquisition de la conformation de l'ectodomaine de G, les résultats rapportés ci-dessus ont orienté notre intérêt vers **la région juxtamembranaire**. Il y a deux raisons à cela. La première est que, étant placée immédiatement en amont du DTM, elle se trouve à **proximité** de la membrane. La région juxtamembranaire fait d'ailleurs partie des régions de G susceptibles d'interagir avec la membrane qui ont été délimitées par Durrer *et al.* (1995). La deuxième raison provient des résultats de Gaudin *et al.* (1996), qui ont déjà impliqué les 70 résidus en amont du DTM dans la **régulation** des changements de conformation de l'ectodomaine de N vers I. Le chapitre 2 présente l'étude de la structure de cette région et de son rôle dans le repliement de l'ectodomaine.

Chapitre 2

Rôle de la région juxtamembranaire dans la flexibilité conformationnelle de G

La plupart des anticorps naturellement obtenus contre la G du VR reconnaissent la forme N et sont capables de neutraliser la propagation du virus (Flamand *et al.*, 1993). En revanche, les anticorps reconnaissant la forme I mais pas la forme N ne sont neutralisants qu'après incubation à pH acide (Raux *et al.*, 1995). Le développement d'un protocole de neutralisation adapté a permis à Gaudin *et al.* (1996) de sélectionner des mutants dont le changement de conformation est ralenti. Ces mutants ont été appelés RAIN pour *resistant to acid induced neutralization*.

Les virus RAIN sont viables bien qu'ils se propagent moins bien que le parent CVS. Les mutations RAIN sont ponctuelles et localisées à l'extérieur des sites antigéniques déjà définis. Les mutations affectant la transition de N vers I sont M44I, E282K, V392G et M396T. Les deux dernières sont localisées dans une région dont le rôle dans la fusion avait été signalé par Li *et al.* (1993) à la suite d'expériences de mutagenèse. Cette région présente quelques résidus dont l'identité ou le caractère est conservé chez tous les Rhabdovirus (Gaudin *et al.*, 1996 ; Shokralla *et al.*, 1998). Parmi ces résidus, le motif dipeptidique His-Pro₃₉₇₋₃₉₈ pourrait jouer un rôle clef dans les changements de conformation induits à bas pH (Gaudin *et al.*, 1996). Il a alors été décidé d'étudier la structure de cette région en fonction du pH et son effet sur le repliement de l'ectodomaine de G.

1. Préparation de fragments recombinants de la tige de G

Afin d'analyser le fonctionnement de la région régulatrice au niveau moléculaire, une étude structurale a été entreprise sur des peptides recombinants purifiés. L'observation au microscope électronique d'une tige reliant le domaine globulaire de G à la membrane, et l'absence de pont disulfure permettent de supposer qu'elle se replie de manière autonome. De plus, le fait qu'une partie de la

région 366-438 soit impliquée dans la régulation des changements de conformations avec le pH permet de supposer que sa structure est sensible au pH. C'est pourquoi, bien qu'extraits de leur environnement, il était envisageable que des peptides couvrant cette région adoptent une structure et que cette structure dépende du pH.

1.1 Conception des peptides et choix du système d'expression

Les vues de G au microscope électronique la présentent comme une masse pédonculée (Gaudin *et al.*, 1992). Quand le modèle covalent de l'ectodomaine de G (Walker et Kongsuwan, 1999) est projeté sur cette représentation, il apparaît que les résidus 354 à 439 sont laissés à l'écart du reste de l'ectodomaine et pourraient donc former la tige. Le dipeptide His-Pro₃₉₇₋₃₉₈ est situé au milieu de ce segment, entre deux hélices putatives, prédites avec plus ou moins de force selon le rhabdovirus d'où G est issue (Gaudin *et al.*, 1996).

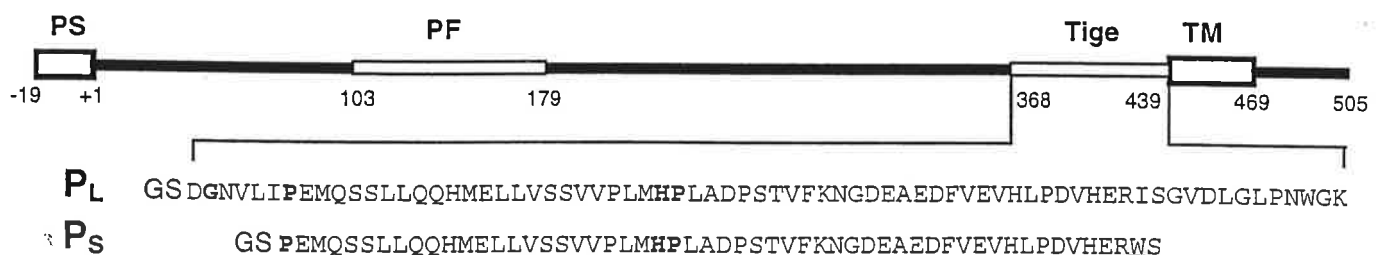


Fig. 2.1 : Schéma des constructions P_L et P_S . Les peptides P_L et P_S reproduisent les segments 368-439 et 374-428 de la protéine G, respectivement. Leur extrémité aminoterminal commune GS résulte de l'assemblage du plasmide recombinant. Ile₄₂₇ a été remplacé par Trp dans P_S (souligné). En gras : les résidus conservés chez tous les Rhabdovirus (Gaudin *et al.*, 1996). PS : peptide signal. PF : région du peptide de fusion (Durrer *et al.*, 1995). Tige : région de la tige. TM : domaine transmembranaire.

Deux peptides couvrant la région régulatrice identifiée par Gaudin *et al.* (1996) ont été produits. Ces peptides ont été centrés sur le motif His-Pro. Le plus grand des deux peptides, P_L , s'étend du résidu 368 au résidu 439 et P_S , le plus petit, de 374 à 428 (**Fig. 2.1**). Le peptide P_L contient naturellement un résidu tryptophanyl (Trp₄₃₇) qui permet la détection et la quantification du peptide. Afin que P_S bénéficie des mêmes avantages, un tryptophanyl a été substitué à Ile₄₂₇ dans P_S .

La région 354-439 de G est dépourvue de site de glycosylation et de pont disulfure ; elle se prête donc à une expression en bactérie. Nous avons adopté le système pGEX-4T1 de Pharmacia qui est inductible et facilite la purification des peptides en les produisant sous forme de protéine de fusion avec la Glutathion Sulfotransferase (GST). Le *linker* reliant la GST aux peptides de G présente un site de clivage pour la thrombine qui a été utilisé pour séparer P_L ou P_S de la GST.

1.2 Purification des peptides P_L et P_S

Après lyse et sonication des bactéries, les protéines solubles contenant la GST ont été purifiées sur une colonne glutathion (GSH) - sépharose. Deux protéines sont purifiées (**Fig. 2.2.A**). Il s'agit de la protéine de fusion attendue (environ 28 kDa) et d'un produit de dégradation de celle-ci (environ 26 kDa). La protéine de fusion était majoritaire (environ 80 %) dans tous les échantillons que nous avons utilisés.

Les deux bandes sont sensibles à la thrombine, et après quatre heures d'incubation, le clivage est total (**Fig. 2.2.B**). La séparation du peptide recombinant et de la GST est assurée par une combinaison de chromatographies d'affinité pour le GSH et échangeuse d'anions (MonoQ). Le produit final est pur d'après la coloration au bleu de Coomassie (**Fig. 2.2.C**).

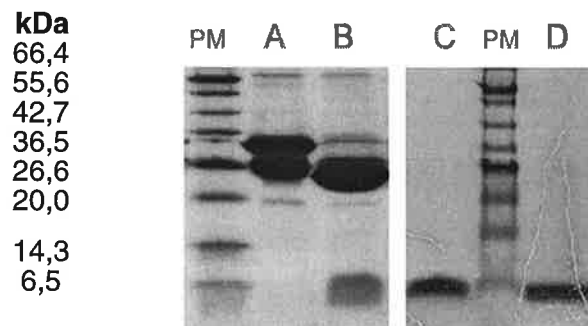


Fig. 2.2 : Purification des peptides P_L et P_S. **A.** Protéine de fusion P_S-GST purifiée sur colonne de glutathion (voir Méthodes). SDS-PAGE 18 %. **B.** Produit du clivage par la thrombine après quatre heures d'incubation (voir Méthodes). Peptides P_S (**C.**) et P_L (**D.**) purifiés (voir Méthodes). SDS-PAGE 10-20 %. PM : marqueurs de masse moléculaire.

Les échantillons ainsi préparés ont été dialysés contre le tampon approprié (pH, force ionique) et concentrés sur des Centricon 3 jusqu'à une concentration de 2 mg/ml ou 5 mg/ml, selon l'application à laquelle ils étaient destinés.

1.3. Caractérisation de P_L et P_S par ultracentrifugation à l'équilibre

La protéine G est trimérique. Les résultats obtenus avec G_{4G} (chapitre 1) suggèrent que la continuité du domaine transmembranaire et de la "tige" influence la stabilité du trimère. Ce résultat pourrait s'expliquer par la synergie de facteurs influençant l'oligomérisation qui se trouveraient à la fois dans le DTM et dans l'ectodomaine, et plus précisément, à proximité du DTM, dans la tige.

La masse des peptides P_L et P_S a été étudiée par ultracentrifugation à l'équilibre à 4°C et la structure quaternaire a été déduite de cette valeur. La distribution des peptides dans la cellule a été enregistrée à quatre vitesses différentes, pour chacune desquelles une modélisation satisfaisante a été obtenue par l'application du modèle d'une espèce unique en solution (**Fig. 2.3**).

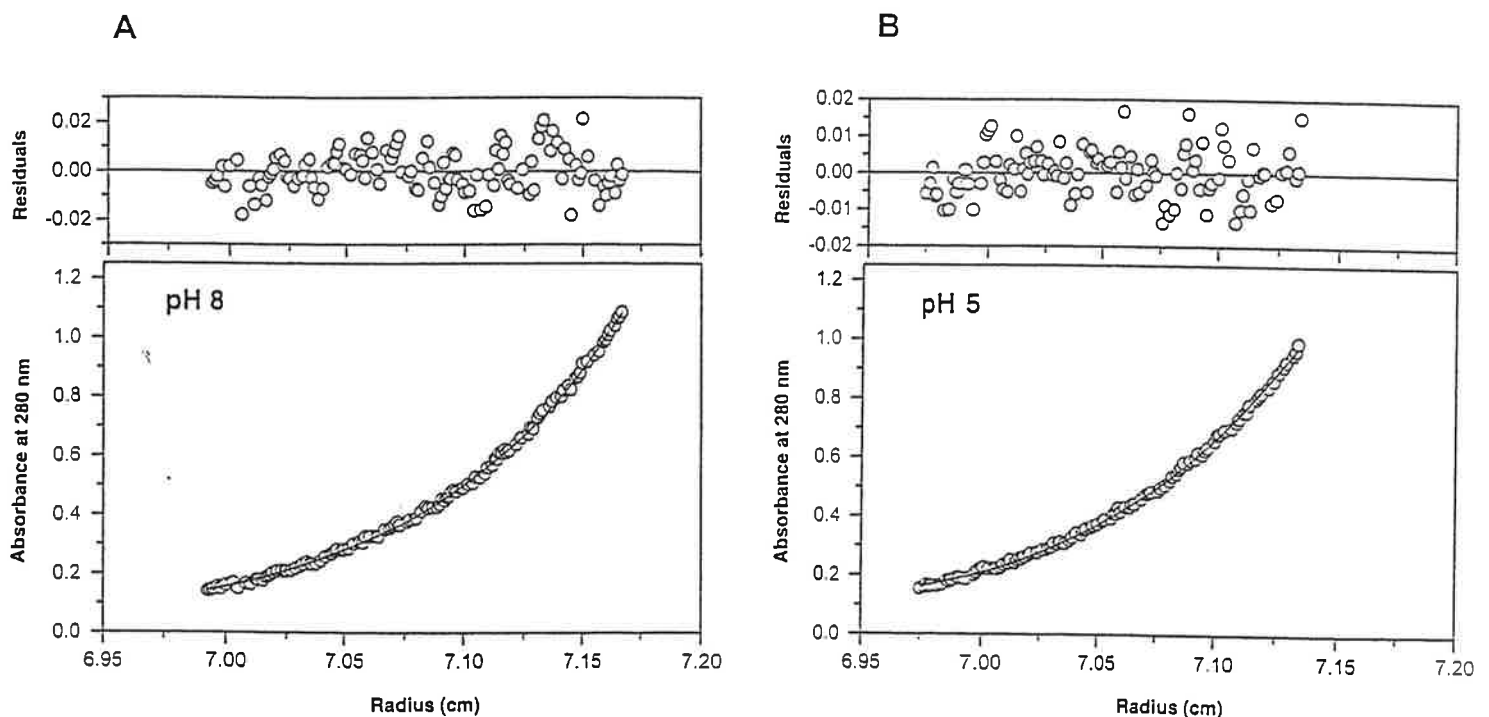


Fig. 2.3 : Ultracentrifugation à l'équilibre de P_L . A. P_L a été analysé à pH 8 (Tris 50 mM) et B. pH 5 (acétate 20 mM), à 4°C. La concentration de P_L était de 80 μ M, de manière à ce que l'absorbance à 280 nm soit proche de 1 dans le fond de la cuve. Les données présentées ici ont été obtenues à l'équilibre à 42000 rpm. La masse de P_L déterminée d'après ces résultats est de 7995 Da et de 7984 Da, à pH 8 et pH 5 respectivement.

Les masses mesurées pour les peptides P_L et P_S à pH 8 sont 7995 Da et 6347 Da, respectivement, ce qui correspond sans ambiguïté à la masse du monomère qui est de 8087 Da dans le cas de P_L et de 6411 Da dans celui de P_S . A pH 5, la masse mesurée pour P_L (7948 Da) n'est pas significativement différente de la mesure faite à pH 8 : P_L est donc monomérique aux deux pH. Ces résultats ont montré que la région 366-439 ne permet pas la trimérisation dans les conditions de notre étude.

2. Etude spectroscopique de P_L et P_S à pH 5 et pH 8

2.1 Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (DC) est la propriété d'une substance optiquement active qui absorbe différemment des ondes polarisées circulairement à droite et à gauche. La substance dont il est question peut être un chromophore intrinsèquement asymétrique ou bien un chromophore placé dans un environnement asymétrique. Ce phénomène est amplifié par les structures asymétriques périodiques comme les éléments de structure secondaire (**Fig. 2.4.B**).

Le dichroïsme circulaire est une spectroscopie d'absorption : le signal enregistré est donc cumulatif. Afin de pouvoir décomposer le signal résultant en signaux élémentaires caractéristiques des différents éléments de structure secondaire, la technique la plus utilisée, dite de la sélection variable, consiste à déterminer une combinaison de spectres de protéines dont la structure est connue, qui permette de modéliser le signal enregistré avec une précision satisfaisante. Nous avons utilisé le jeu de spectres et le programme VARSELEC proposés par Manavalan et Johnson (1987).

Les échantillons étudiés au dichrographe ont été dialysés contre des tampons de faible force ionique, dont le chlore est absent (phosphate de sodium 10 mM à pH 8 ou acétate de sodium 10 mM à pH 5) et à la concentration de 80 μ M (pH 8) et 60 μ M (pH 5). Les spectres obtenus pour le peptide P_L à pH 8 et à pH 5 sont très semblables et traduisent une hélicité très faible. Les résultats de l'analyse quantitative montrent en effet 50% de structures non canoniques et la prépondérance des β -turns et des structures étendues, de type brin β , parmi les éléments de structure secondaire (**Tab. 2**).

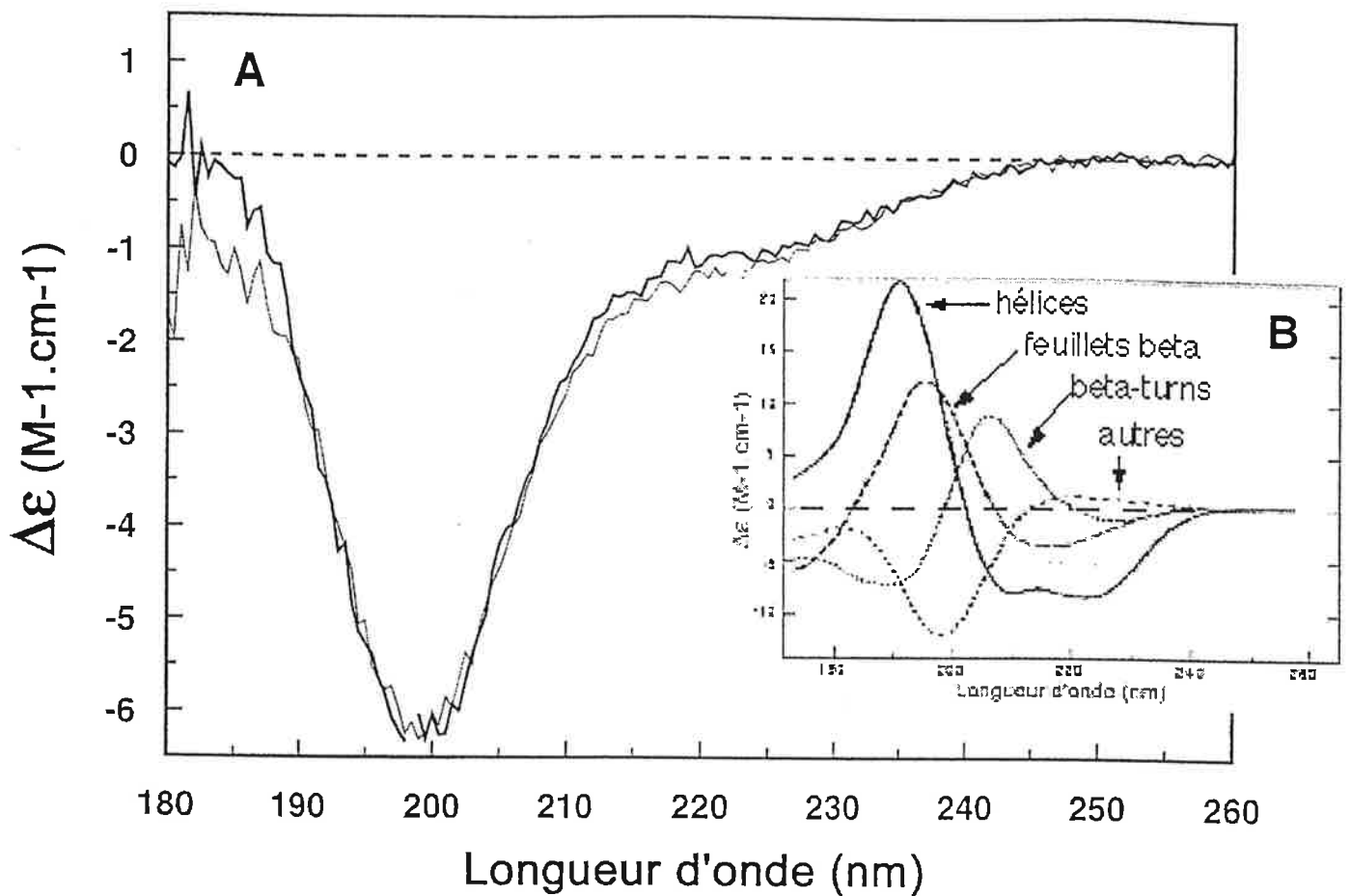


Fig. 2.4 : Etude de P_L par dichroïsme circulaire. A. Spectres dichroïques de P_L à pH 5 (tracé épais) et à pH 8 (tracé maigre). Les spectres présentés ont été enregistrés avec une concentration de $60 \mu\text{M}$ (pH 5) et $80 \mu\text{M}$ (pH 8), à 20°C . B. Spectres dichroïques typiques des différents éléments de structure secondaire dans l'UV.

Tab. 2. Produit de la déconvolution des spectres de la Figure 2.4.A.

	α	non canonique	β	turn
P_L à pH 8	$4 \% \pm 2$	$47 \% \pm 3$	$13 \% \pm 3$	$36 \% \pm 3$
P_L à pH 5	$2 \% \pm 2$	$51 \% \pm 4$	$17 \% \pm 3$	$30 \% \pm 3$

Chaque technique spectroscopique a son champ d'application privilégié. Le dichroïsme circulaire est plus approprié pour étudier l'hélicité des polypeptides. Une technique complémentaire a donc été employée pour caractériser la structure secondaire de P_L. La spectroscopie infrarouge, réputée plus sensible aux éléments de structure non hélicoïdaux que le dichroïsme circulaire (Sarver et Krueger, 1991) a été choisie dans ce but.

2.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

L'énergie des bandes d'absorption de l'IR correspond à l'énergie de vibration des liaisons covalentes. La structure secondaire du squelette peptidique peut donc être étudiée à travers les bandes correspondant aux liaisons CO et NH de la liaison peptidique : leur énergie vibrationnelle dépend en effet de leur participation à une liaison hydrogène ou non (**Fig. 2.5.B**).

Les signaux propres au random coil (1640 cm^{-1}) et aux hélices (1650 cm^{-1}) sont très proches. Bien que les conditions d'expérimentation en DC et en IR diffèrent notablement (cf. légendes des **Fig. 2.4** et **2.5**), ces signaux ont été rassemblés pour tenir compte des résultats du DC d'après lesquels le signal des hélices peut être considéré comme négligeable. C'est pourquoi un signal à 1645 cm^{-1} a été pris en compte pour la déconvolution et attribué au random coil.

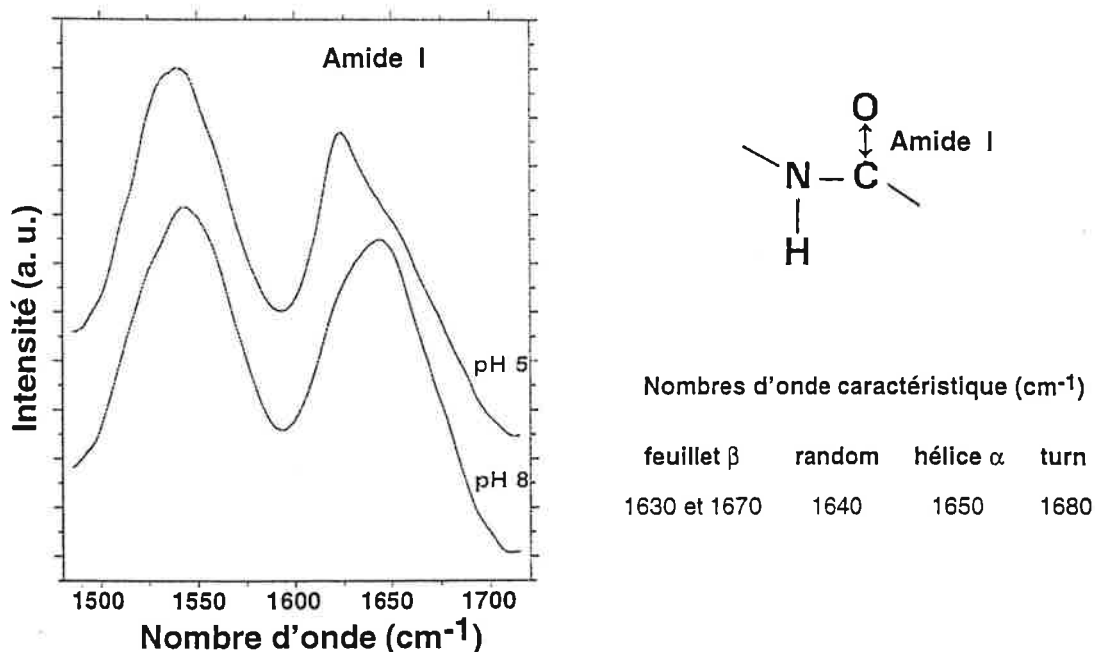


Fig. 2.5 : Etude du peptide P_L par spectroscopie IR-TF. A. Spectres IR-TF de P_L à pH 5 et pH 8. Ces spectres ont été enregistrés à une concentration de 220 μM (1,8 mg/ml) à 20°C. **B.** Informations relatives à la liaison peptidique présentes dans la bande amide I.

Les différents éléments de structure ont été quantifiés en rapportant l'aire de chaque pic caractéristique à celle de l'ensemble des pics issus de la déconvolution de la bande amide I. La structure secondaire des peptides P_L et P_S a été étudiée à pH 8 et à pH 5 (**Fig. 2.5.A**).

Tab. 3 : Résultat de la déconvolution des spectres IR enregistrés pour P_L et P_S à pH 8 et à pH 5. Les nombres d'onde (en cm⁻¹) des pics déconvolués dans la bande amide I sont indiqués entre parenthèse. A pH 8, 28 résidus de P_L et 23 résidus de P_S adopteraient une structure de type β. A pH 5, ces nombres seraient de 44 et 37 pour P_L et P_S, respectivement. Les réarrangements concerneraient alors au moins 16 résidus de P_L ou 14 résidus de P_S.

Peptide		β	random + α	Turn
P _L	pH 8	38 % (1620 + 1675)	59 % (1649)	3 % (1689)
	pH 5	60 % (1622 + 1670)	35 % (1647)	5 % (1685)
P _S	pH 8	43 % (1619 + 1675)	55 % (1649)	2 % (1690)
	pH 5	67 % (1622 + 1667)	27 % (1648)	6 % (1683)

A pH 8, les spectres de P_L et P_S présentent un maximum aux alentours de 1640 cm⁻¹, mais la déconvolution des spectres indique que ces peptides pourrait contenir respectivement 38% et 43% de structure de type brin β. A pH 5, l'aspect des spectres diffère nettement des précédents par un décalage du maximum d'absorption de l'amide I de 1642 cm⁻¹ à 1622 cm⁻¹ dans le cas de P_L (**Fig. 2.5.A**) et de 1637 cm⁻¹ à 1622 cm⁻¹ dans le cas de P_S. Cet effet clair et reproductible peut être interprété en termes de réarrangement des éléments de structure secondaire à la suite de l'abaissement du pH (**Tab. 3**). A pH 5, 60% des résidus de P_L et 65% des résidus de P_S pourraient participer à des structures de type brin β.

La comparaison des spectres d'absorption infrarouge des peptides à pH 8 et pH 5 permet de suggérer que la structure de la région étudiée est effectivement sensible au pH, et que ceci concernerait plus particulièrement des éléments de type β. Une caractérisation plus fine de la structure de la tige a été entreprise.

3. Caractérisation structurale de P_S

Une nouvelle technique a été utilisée pour compléter l'étude précédente : la Résonance Magnétique Nucléaire, qui a l'avantage d'utiliser des protéines en solution et qui se prête facilement à l'étude des peptides.

3.1. RMN

Les signaux de la RMN sont sensibles à l'environnement électronique d'un type d'atomes : selon le protocole, la modification de cet environnement est due à une liaison covalente ou au rapprochement dans l'espace de groupes éloignés dans la séquence. Nous avons étudié l'environnement électronique des noyaux ¹H des groupes CO-NH et C α -H.

Le spectre NOE (non montré) est caractéristique d'un peptide non replié. Il ne révèle aucune interaction privilégiée en dehors de l'enchaînement covalent des résidus. Le peptide P_S n'a donc pas de conformation définie à pH 5. L'attribution du spectre a été faite de manière aussi complète que possible (la répétition de certains résidus dans la partie aminoterminal de P_S et l'absence de structure secondotertiaire rendent moins fiable l'attribution des signaux correspondant) : l'index des déplacements chimiques ainsi obtenu (Domanski et Guittet, communication personnelle) traduit avant tout une absence de structure complexe, ce qui montre qu'un environnement aqueux est défavorable au repliement de ce peptide. D'après les déplacements chimiques mesurés, il est néanmoins possible que des résidus carboxyterminaux manifestent une légère tendance à former une hélice (Domanski et Guittet, communication personnelle). Cette observation a orienté le choix des expériences suivantes.

La contradiction apparente entre ces résultats et ceux qui sont issus de la spectroscopie IR sera commentée ultérieurement (section 3.3.).

3.2. Effet d'un cosolvant

Les couplages observés par RMN sont faibles mais sont tout de même considérés comme significatifs. Les cosolvants sont parfois utilisés pour révéler ou accentuer une tendance à adopter

une structure. Parmi les cosolvants, le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) est l'un des plus utilisés. Son emploi est contesté par certains auteurs à cause de son aptitude à induire des hélices mais il est généralement toléré dans des expériences de titration qui permettent de reconnaître les conditions favorables à l'observation de structures natives (Najbar *et al.*, 1997) et quand il faut mimer l'environnement membranaire (Op de Beeck *et al.*, 2000). L'effet du TFE a d'abord été caractérisé en DC avant d'être utilisé dans une étude par RMN.

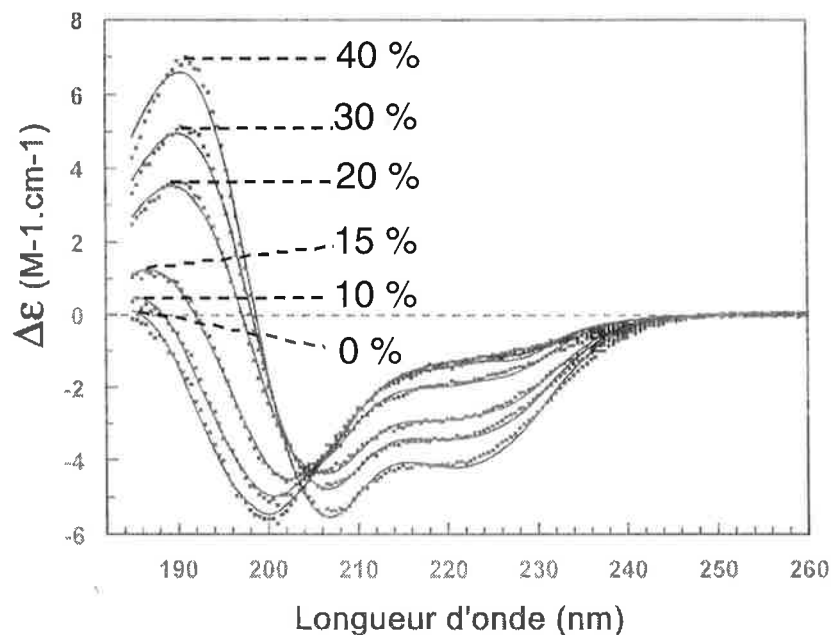


Fig. 2.6 : Effet du TFE sur le spectre dichroïque de P₅. Les spectres ont été obtenus à 4°C et à concentration constante en peptide : [P₅] = 110 μM (0,7 mg/ml). Le pourcentage de TFE est indiqué à côté de chaque spectre.

Des concentrations croissantes de TFE ont un effet clair sur la structure de P₅ : l'hélicité du peptide est renforcée (**Fig. 2.6**). Le spectre dichroïque devient caractéristique d'une conformation hélicoïdale à 15% de TFE. Jusqu'à 10% de TFE, l'hélicité augmente exclusivement aux dépens du random et des turns, après quoi la proportion des structures étendues (type β) diminue tandis que l'hélicité ne cesse d'augmenter (**Tab. 4**).

A l'exception du spectre enregistré dans 40% de TFE, on constate que l'effet du TFE sur l'hélicité de P₅ est caractérisé par un point isobestique (**Fig. 2.6**). Ceci indique que l'on observe une transition entre deux types de spectre. La signification de ces deux types de spectres et de la transition induite par le TFE sera discutée plus bas, en même temps que l'ensemble des données accumulées sur les deux peptides.

Les spectres NOE de P_S en présence de TFE ont été enregistrés mais la lisibilité de ces spectres est mauvaise et aucune information précise n'a pu en être tirée (Domanski et Guittet, communication personnelle).

Tab. 4 : Produit de la déconvolution des spectres DC enregistrés pour P_S, à concentration croissante en TFE.

La déconvolution a été réalisée à l'aide du programme VARSELEC à partir d'une banque de 33 protéines. % α représente le pourcentage d'hélices α , % β celui des feuillets β , % β -turn celui des turns et % autre, celui des structures non canoniques.

% TFE	% α	% β	% β-turn	% autre
0	7	17	33	41
5	9	18	32	41
10	14	17	31	38
15	26	13	27	34
20	32	10	26	32
40	39	8	25	28

3.3. Bilan

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus ne permet pas de proposer un modèle de la structure de P_L ou de P_S. Nous avons tout de même montré qu'une partie au moins de la région concernée, probablement sa partie carboxyterminale, tend à adopter une conformation en hélice. A côté des résidus en hélice, une proportion non négligeable de résidus sont dans une conformation étendue. Ce sont essentiellement ces éléments dont la structure serait sensible au pH, d'après la spectroscopie IR.

La présentation des résultats ci-dessus appelle quelques commentaires. Chaque technique mise en oeuvre a contribué à caractériser la structure de P_L et P_S mais chacune nous renseigne dans les limites de sa perception.

Il est possible de concilier les résultats des spectroscopies DC et IR en reprenant l'idée selon laquelle ces deux techniques sont complémentaires. Pour concilier ceux de la RMN et de l'IR, il faut

rappeler que les interactions observées par IR et RMN n'ont pas la même durée de vie. En effet, le **temps d'accumulation** des mesures de RMN est proche de la milliseconde, tandis que celui du DC ou de l'IR est de l'ordre de la picoseconde. Le DC et l'IR sont donc capables de détecter des interactions dont la durée de vie est de l'ordre de 10^{-12} seconde tandis que la RMN ne restitue qu'une moyenne de tous les événements dont la durée de vie est inférieure à 10^{-3} seconde. Les éléments de structure étendue mis en évidence par la spectroscopie IR seraient trop labiles pour être détectés par RMN.

Cependant, au moins deux autres interprétations doivent être envisagées concernant les résultats de la spectroscopie IR. La première explique le renforcement du signal généralement attribué aux feuillets β par **l'agrégation** des peptides à pH 5. La formation d'amyloïdes est courante pour les peptides en solution, et cette proposition est appuyée par le fait que P_S et P_L ont un pI théorique voisin de 4,5 qui reflète leur richesse en résidus glutamyl et aspartyl (**Fig. 2.1**). L'affaiblissement de la répulsion électrostatique entre peptides pourrait permettre leur agrégation sous une forme amyloïde, c'est-à-dire de type β . De plus, la concentration des échantillons analysés en IR ou par RMN est six fois supérieure à celle des échantillons analysés par DC, ce qui est susceptible de favoriser l'agrégation du peptide. Bien que celle-ci n'aît pas été détectée en RMN, il faut préciser que les échantillons IR ont été disposés dans une cuve ATR (*attenuated total reflection*), dans laquelle le faisceau rentre dans l'échantillon par en-dessous et n'en traverse que les couches inférieures : la détection de tels agrégats, mêmes petits et minoritaires, serait facilitée.

D'autre part, une modification similaire du signal IR en fonction du pH a été observée avec la thymosine β_4 (non montré), alors que l'étude par RMN de ce peptide de 43 résidus a montré qu'elle n'a pas de structure définie en solution, si ce n'est quelques segments hélicoïdaux (Czisch *et al.*, 1993). Il est possible que ces signaux correspondent à des liaisons hydrogènes avec le solvant, mais nous ne pouvons pas non plus exclure l'existence d'un artefact lié au conditionnement de nos échantillons, au tampon par exemple.

Aucun élément de structure canonique n'a été détecté de manière claire par l'ensemble des techniques utilisées. Cette situation est fréquente avec les peptides extraits de leur environnement d'origine et étudiés en solution (Najbar *et al.*, 1997). Cela signifie que le repliement de ces objets est sous l'influence de contraintes extérieures au peptide.

L'absence de structure définie pour les peptides P_L et P_S en solution montre que certains facteurs font défaut au repliement de tout ou partie des résidus 368-439. Ces facteurs peuvent être de nature protéique et / ou lipidique. En effet les résultats du chapitre 1, en révélant un effet de la membrane sur le repliement de l'ectodomaine de G, suggèrent que des interactions protéine-membrane interviennent dans le repliement de l'ectodomaine. L'élucidation de l'influence éventuelle de la membrane sur la structure de P_L ou de P_S pourrait être testée par les mêmes techniques spectroscopiques (DC, IR-TF et RMN) en présence de micelles de détergent ou de lipides. Une telle approche a été utilisée avec succès par Soulié et al. (1999) afin de caractériser la structure de l'un des domaines transmembranaires de la Ca²⁺-ATPase du reticulum sarcoplasmique.

Le TFE est parfois utilisé afin de stabiliser des éléments de structure dans des peptides ou des protéines dénaturés (Najbar *et al.*, 1997). De ce point de vue, l'existence d'un isobeste lors de la transition conformationnelle induite par le TFE est souvent considéré comme la conséquence d'un équilibre entre une forme dénaturée et une forme structurée. Cependant, le peptide P_S étant peu structuré il est possible que l'on ait à faire à un équilibre entre deux états multiples, reflétés chacun par un type de spectre particulier. Ceci résulterait d'un effet global du TFE sur l'ensemble des conformations en équilibre au lieu de la stabilisation d'une conformation vers laquelle l'équilibre serait déplacé.

D'autres techniques pourraient être utilisées afin de caractériser une éventuelle interaction de P_L ou de P_S avec la membrane. Par exemple, il pourrait être intéressant de comparer la fluorescence intrinsèque du tryptophanyl (naturel) de P_L en présence et en absence de liposomes.

Dans la suite, nous avons caractérisé la région juxtamembranaire au sein de la protéine complète, comme dans le chapitre 1, par mutagenèse.

4. Rôle de la région 396-438 dans le repliement de G

Les résultats présentés dans le chapitre 1 montrent que la conformation de l'ectodomaine de G est sensible à la proximité de la membrane. Cette observation permet de suggérer une interaction entre l'ectodomaine et la membrane.

Durrer *et al.* (1995) ont montré qu'à pH neutre, les seuls résidus de l'ectodomaine de G qui sont marqués par une sonde hydrophobe radioactive photoactivable sont ceux du DTM. Néanmoins, la méthode d'analyse ne permet pas d'exclure une éventuelle incorporation du marqueur dans les résidus 397 à 505, donc une interaction de cette région avec la membrane. Par ailleurs, les travaux de Robison et Whitt (2000) sur le bourgeonnement du VSV permettent de suspecter une interaction entre les 12 résidus juxtamembranaires et la membrane. L'interaction éventuelle de l'ectodomaine avec la membrane pourrait affecter l'ectodomaine *via* la région juxtamembranaire.

Cette hypothèse ainsi que les propositions de Gaudin *et al.* (1996) sur le rôle du motif His-Pro₃₉₇₋₃₉₈ justifient l'étude du rôle de la région juxtamembranaire dans le repliement de l'ectodomaine. Une approche par substitution et délétion a été utilisée pour identifier des résidus critiques pour le repliement de l'ectodomaine de la région juxtamembranaire.

4.1. Dissection de la région juxtamembranaire

4.1.1. Identification des résidus conservés dans la région juxtamembranaire de G

L'examen d'un alignement des séquences de la G des Rhabdovirus met en évidence la conservation du résidu Trp₄₃₇ chez tous les Rhabdovirus (**Fig. 2.7**). En amont, les séquences divergent, mais le caractère de deux groupes de résidus a été préservé. Le premier groupe contient des résidus plutôt hydrophobes à l'exception d'un aspartyl et, en amont, le deuxième groupe contient des résidus acides. Chez le VR, ces deux groupes s'articulent autour de Pro₄₂₀.

4.1.2. Altération des résidus conservés dans la région juxtamembranaire

Plusieurs séries de mutants de délétion ont été construites afin de mettre en évidence la participation de certains résidus au repliement de l'ectodomaine de G. A l'exception de courtes délétions limitées aux résidus précédant le DTM, qui n'ont pas eu d'effet sensible, le repliement a en général été gravement perturbé (non montré ; cf. **Tab. 5**, p. 117).

En revanche, des mutations ciblées sur les résidus de G les mieux conservés ont permis d'obtenir des résultats satisfaisants.

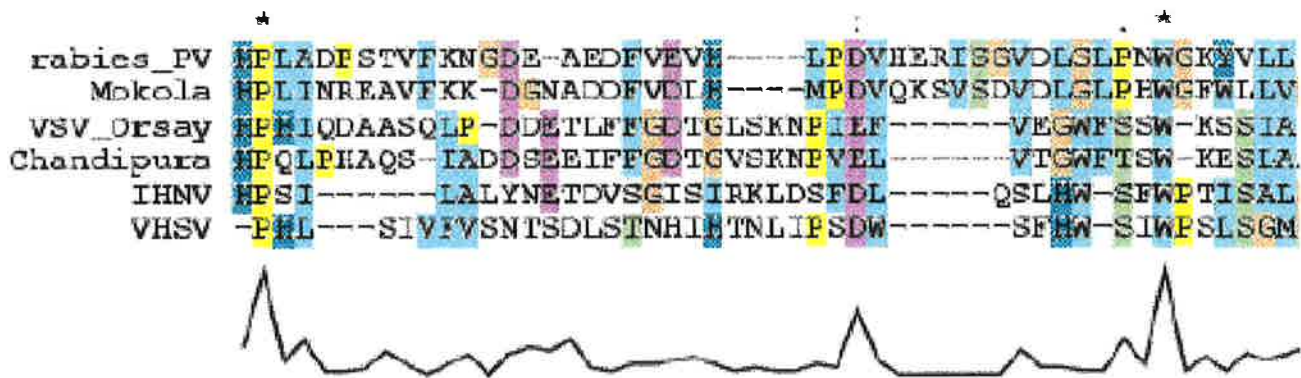


Fig. 2.7 : Alignement des séquences juxtamembranaires de l'ectodomaine de G. Les étoiles signalent les résidus conservés dans toutes les séquences. Cet alignement a été produit manuellement afin de mettre en évidence la conservation de certains caractères conservés chez les Lyssavirus (PV et Mokola) et les Vésiculovirus (VSV et Chandipura). Les Novirhabdovirus (IHNV et VHSV) perturbent l'alignement. Le VHSV est le seul Rhabdovirus ne présentant pas le motif HP à cet endroit.

La conservation de Trp₄₃₇ en fait une cible de choix pour la mutagenèse. Un tyrosyl (G_{W437Y}), un isoleucyl (G_{W437I}) ou un aspartyl (G_{W437D}) lui a été substitué afin de tester séparément les effets de l'aromaticité et de l'hydrophobicité. Le repliement de ces mutants a été testé au moyen des trois anticorps monoclonaux sélectionnés dans le chapitre 1 : 21H8, 30AA5 et 41BC2. D'après cette expérience, aucune des trois substitutions envisagées n'altère significativement le repliement de G (**Fig. 2.8**). Le fait que G_{W437D} se replie comme G_{WT} démontre que le tryptophanyl n'est pas indispensable pour le repliement sous la forme N (mais le signal correspondant aux anticorps 30AA5 et 41BC2 a été jugé plus faible en proportion par rapport à 21H8 pour G_{W437D} que pour G_{WT} dans les deux expériences que nous avons réalisées).

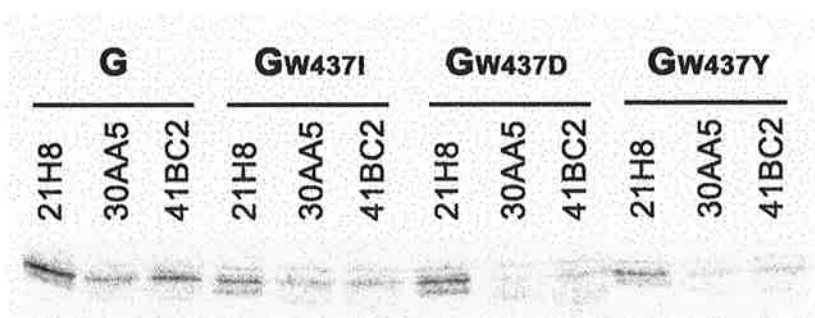


Fig. 2.8 : Antigénicité de G_{W437Y}, G_{W437D}, G_{W437I}. Après 10 minutes de marquage et 60 minutes de chasse, les cellules ont été lysées à froid dans du TD contenant 1% de CHAPS. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps indiqués.

L'importance des résidus acides -DEAED chez la souche PV du VR - pour le repliement de G a été testée grâce à deux mutants : 1- $G_{\Delta DEAED}$ dans lequel le motif DEAED et les deux résidus flanquants ont été délétés et 2- $G_{DEAFVED}$ obtenu en remplaçant la séquence DEAEDFV par DEAFVED (Fig. 2.9.A). $G_{\Delta DEAED}$ se replie mal, mais $G_{DEAFVED}$ a une efficacité de repliement de l'ordre de 40% et semble se replier sous une forme alternative (Fig. 2.9.B).

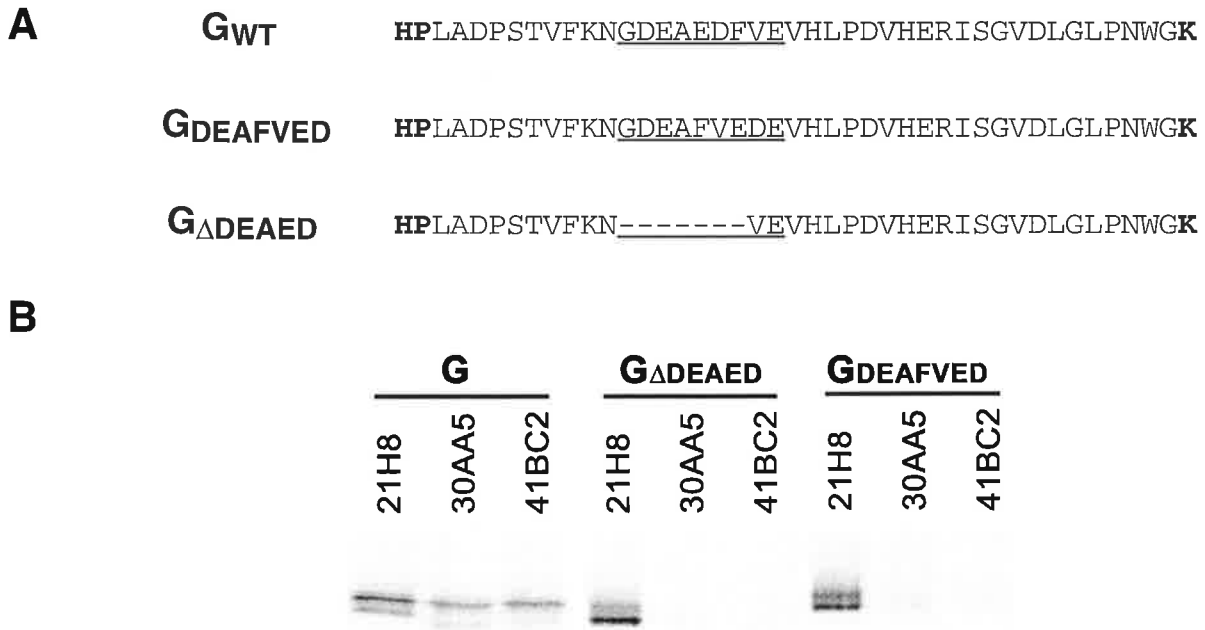


Fig. 2.9 : Mutagenèse du groupe de résidus acide. A. Schéma des mutations réalisées. Les résidus concernés sont soulignés. Le motif His-Pro et le Lys marquant le début du DTM sont en gras. **B.** Antigénicité de $G_{\Delta DEAED}$ et de $G_{DEAFVED}$. Après 10 minutes de marquage et 60 minutes de chasse, les cellules ont été lysées à froid dans du TD contenant 1% de CHAPS. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps indiqués.

4.1.3. Bilan

Ces expériences de mutagenèse sont le début d'une caractérisation plus fine de la région juxtamembranaire et de son rôle dans le repliement de G. Elles nous ont permis d'identifier les résidus $DEAED_{410-414}$ comme critiques pour le repliement de l'ectodomaine de G sous la forme N alors que la délétion des éléments les plus proches de la membrane est bien tolérée.

4.2. Rôle du motif His-Pro₃₉₇₋₃₉₈ dans le repliement de G

4.2.1. Signification du motif His-Pro

Gaudin *et al.* (1996) ont montré que des mutations dans la région correspondant à la tige sont capables de ralentir les changements de conformations et la réalisation des propriétés fusogènes de G. La structure primaire de cette région est caractérisée par la présence d'un motif His-Pro chez toutes les G de Rhabdovirus connues. Le pK de la transition structurale de G est voisin de 6,7 (Gaudin *et al.*, 1993). La proximité de cette valeur avec celle du pK de l'histidine en solution a conduit Gaudin *et al.* (1996) à suggérer que l'histidinyl du motif His-Pro pourrait jouer le rôle de senseur du pH, et que sa protonation déclencherait des réarrangements conformationnels conduisant à la fusion ou l'inactivation.

Un rôle plausible a donc été proposé pour His₃₉₇. Nous complétons maintenant cette hypothèse en proposant un rôle pour le résidu Pro₃₉₈. Le prolyl se distingue des autres résidus par la contrainte stérique qu'il exerce sur le squelette peptidique, mais aussi par sa capacité d'isomérisation dans un équilibre *cis-trans*. Le motif His-Pro associe donc un senseur du pH et un point où la contrainte structurale est forte et modifiable. Or l'équipe de Günter Fischer a montré que l'état de protonation de l'histidinyl qui précède un prolyl influence la cinétique de l'oligomérisation *cis-trans* de ce dernier (Reimer *et al.*, 1997). Le couplage entre l'acidification du pH et les réarrangements structuraux de l'ectodomaine de G pourrait résulter de l'effet de la protonation de His₃₉₇ sur l'isomérisation de Pro₃₉₈, laquelle affecterait la conformation de l'ectodomaine. Il faut toutefois être prudent, et essayer de vérifier si les observations de Reimer *et al.* (1997) sont envisageables dans le cas de la G.

4.2.2. Mutagenèse du motif His-Pro

La protonation de His₃₉₇ crée une charge positive. Afin de nous rapprocher le plus possible de cette situation, le mutant G_{H397K} a été construit mais son repliement est compromis (**Fig. 2.10.A**). Aucune conclusion ne peut donc être tirée de ce résultat.

Permutation des résidus His₃₉₇ et Pro₃₉₈

Le mutant G_{PH}, où les deux résidus His₃₉₇ et Pro₃₉₈ sont permutés, a été construit afin de vérifier l'hypothèse de la participation de l'isomérisation de Pro₃₉₈ au changement de conformation de G. L'effet de l'histidinyl sur la cinétique d'isomérisation du prolyl ne peut pas exister dans ces conditions (Reimer *et al.*, 1997). Ce mutant se replie avec une efficacité satisfaisante et sous une forme

alternative (Fig. 2.10.B).

Modification des contraintes apportées par Pro₃₉₈ au squelette peptidique

Pro₃₉₈ a aussi été muté. Gly et Ile, dont la chaîne latérale a une taille similaire à celle de Pro, lui ont été substitués dans les mutants GP_{398G} et GP_{398I} respectivement. Le repliement de ces deux protéines a été trouvé similaire à celui de G_{WT} (Fig. 2.10.C).

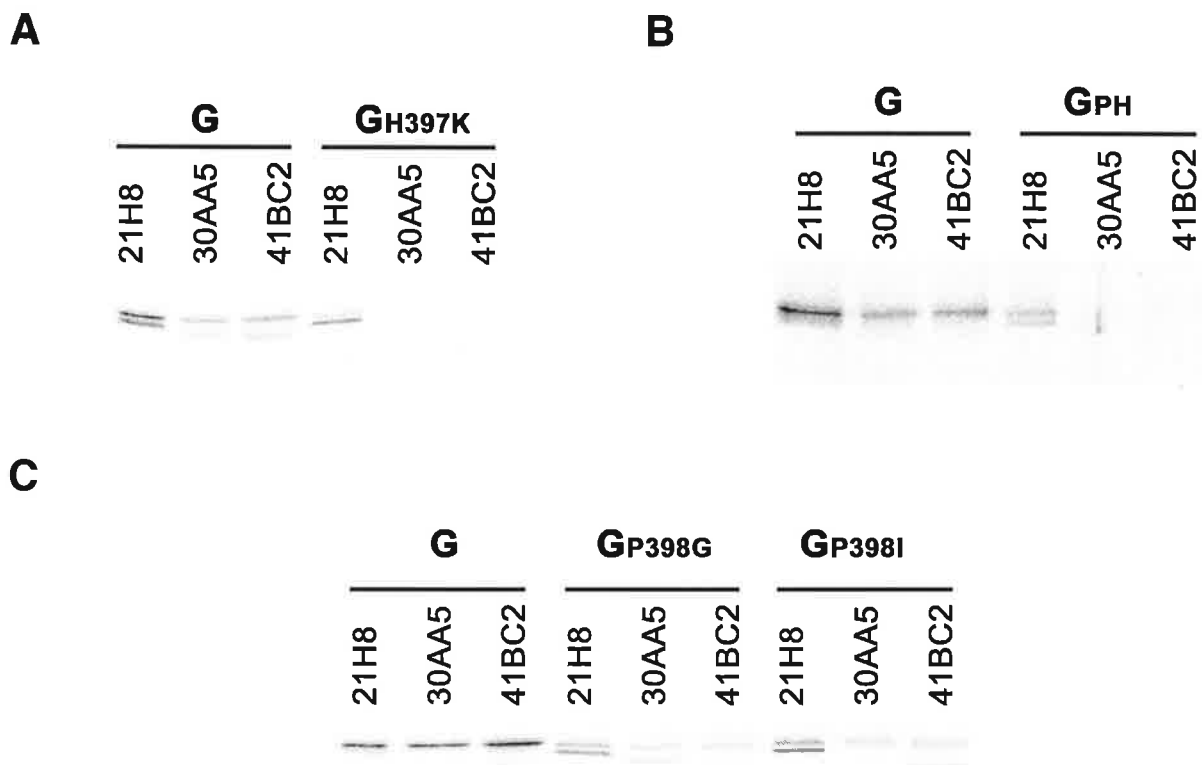


Fig. 2.10 : Antigénicité des mutants du motif His-Pro₃₉₇₋₃₉₈. A. GH_{397K}. B. G_{PH}. C. GP_{398I} et GP_{398G}. Après 10 minutes de marquage et 60 minutes de chasse, les cellules ont été lysées à froid dans du TD contenant 1% de CHAPS. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps indiqués.

Le fait que Pro₃₉₈ soit remplaçable par Ile ou Gly peut être expliqué de deux façons au moins. Selon la première, sa conservation ne devrait rien à ses propriétés d'isomérisation et l'hypothèse présentée plus haut serait fautive. La deuxième, plus prudente, consiste à rappeler que Pro n'est pas le seul résidu à pouvoir s'isomériser (pour revue : Eyles, 2001) et que l'isomérisation est parfois dirigée par l'environnement tertiaire autant que par le résidu amont (références citées dans Reimer *et al.*, 1998). Cela signifie que les résidus Ile et Gly placés dans l'environnement de Pro₃₉₈ pourraient reproduire ses propriétés d'isomérisation dans une certaine mesure.

Le phénotype du mutant G_{PH} qui consiste en une modification relativement modeste, est relativement encourageant. Une mutagenèse plus exhaustive doit être entreprise afin de décrire l'effet du motif His-Pro₃₉₇₋₃₉₈ dans le repliement de l'ectodomaine de G. Les observations de Reimer *et al.* (1998) qui ont réalisé une étude systématique de l'effet du résidu amont sur l'isomérisation de Pro fournissent des indications pour la mutagenèse en même temps qu'un cadre à l'analyse des résultats à venir.

Ce travail nous a amené à construire un certain nombre de mutants, dont tous n'ont pas un phénotype sensible au niveau du repliement. La caractérisation de ces mutants a été complétée par une étude fonctionnelle, qui fait l'objet du troisième chapitre.

Chapitre 3

Participation du domaine transmembranaire et de la région juxtamembranaire externe à la fusion membranaire

La fusion membranaire résulte de l'action de G sur les deux membranes destinées à fusionner. Cette action s'exerce à travers les réarrangements conformationnels de G qui contribuent à rapprocher les deux membranes et à les déstabiliser. Dans les deux premiers chapitres, nous avons recherché et parfois mis en évidence des facteurs influençant le repliement de G. Nous allons à présent montrer que certaines des modifications réalisées affectent les réarrangements structuraux qui conduisent à la fusion. Le seul moyen d'expression des différents mutants étant la transfection, un test de fusion a été développé pour des cellules transfectées.

1. Mise au point d'un test de fusion cellulaire

1.1. Différents tests de fusion de cellules

L'observation microscopique des événements impliqués dans la fusion membranaire est actuellement réalisée de trois manières différentes (pour revue : Cohen et Melikyan, 1998). La plus simple consiste à repérer les produits finis de la fusion de plusieurs cellules entre elles, c'est-à-dire des syncytia (White *et al.*, 1981 ; Gaudin *et al.*, 1991). Ce test est qualitatif et peu sensible, car la détection des polycaryons n'est pas toujours aisée. Nussbaum *et al.* (1994) ont développé un test plus sensible reposant sur l'activation du gène de la β -galactosidase placé sous le contrôle de la polymérase T7 par suite de la fusion avec une cellule produisant la polymérase T7. Ce test a l'avantage d'être quantitatif.

Enfin, des méthodes reposant sur l'observation de la redistribution d'un marqueur fluorescent ont été développées plus récemment. Elles sont plus sensibles que les précédentes (appliquées à

l'échelle d'une seule cellule, certaines techniques permettent une étude cinétique). Ces méthodes ont fait l'objet de développements complexes, dans lesquels l'emploi de marqueurs appropriés permet de distinguer le contenu aqueux et chacun des deux feuilletts de la bicouche lors d'un même événement de fusion (Muñoz-Barroso *et al.*, 1998 ; Qiao *et al.*, 1999).

Selon les travaux, l'expression des protéines fusogènes a été réalisée dans des cellules infectées, des cellules transfectées pour expression transitoire ou des lignées stables sélectionnées.

Dans le but de disposer rapidement d'un test qualitatif pour les constructions déjà réalisées, et compte tenu du matériel disponible dans le laboratoire, nous avons décidé d'observer la redistribution de la *Green Fluorescent Protein* (GFP ; déjà disponible sous la forme d'une protéine de fusion avec la protéine P du VR, P-GFP ; la protéine P est dépourvue d'effet cytopathogène) dans des cellules exprimant transitoirement la protéine à tester.

1.2. Choix d'un test fiable

1.2.1. Fusion de cellules infectées avec le virus de la vaccine

Un protocole d'expression transitoire en cellules BSR est couramment utilisé au laboratoire (chapitre 1). Nous avons pratiqué des cotransfections de deux plasmides, l'un codant la G du VR et l'autre la P-GFP. La fluorescence de la GFP permet de reconnaître les cellules transfectées. Après avoir procédé au marquage de la G, nous avons observé une stricte colocalisation de la fluorescence associée à G et de celle de la GFP (Fig. 3.1).

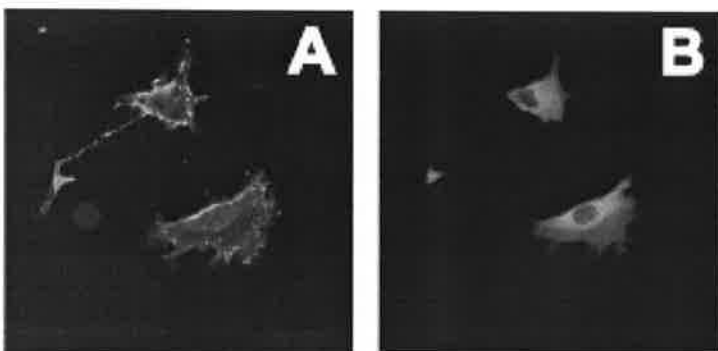


Fig. 3.1 : Colocalisation de G et de P-GFP après cotransfection. **A.** Détection de G à la surface des cellules par immunofluorescence indirecte. L'anticorps primaire est 21H8. L'anticorps secondaire est couplé à la rhodamine. **B.** Fluorescence de la GFP. Les plasmides codant G et la GFP ont été mélangés lors de la transfection.

Les cellules disposées en tapis ont été soumises à une brève incubation à pH 5,8 avant d'être replacées pour une durée variable à l'étuve. Il apparaît que le choc acide doit avoir lieu entre 6 et 24 heures post-transfection et qu'une remise en culture des cellules permet à la fluorescence de la GFP de se redistribuer entre les cellules ayant fusionné, ce qui rend les syncytia plus évidents (non montré).

Le virus de la vaccine utilisé dans le protocole de transfection, est un virus à enveloppe. Bien que se transmettant plutôt de cellule à cellule, il dispose de sa propre machinerie de fusion. Nous avons constaté que cette machinerie était susceptible d'interférer avec le test des différentes protéines G mutées. En effet, des cellules infectées par le VTF7-3 ont formé des syncytia après avoir été exposées à pH acide (**Fig. 3.2.A**). La forme des syncytia est clairement différente dans les deux cas, cependant, considérant qu'ils reflètent une modification de l'aptitude des cellules à fusionner, nous avons mis au point un test qui ne reflète que la capacité fusogène de G.

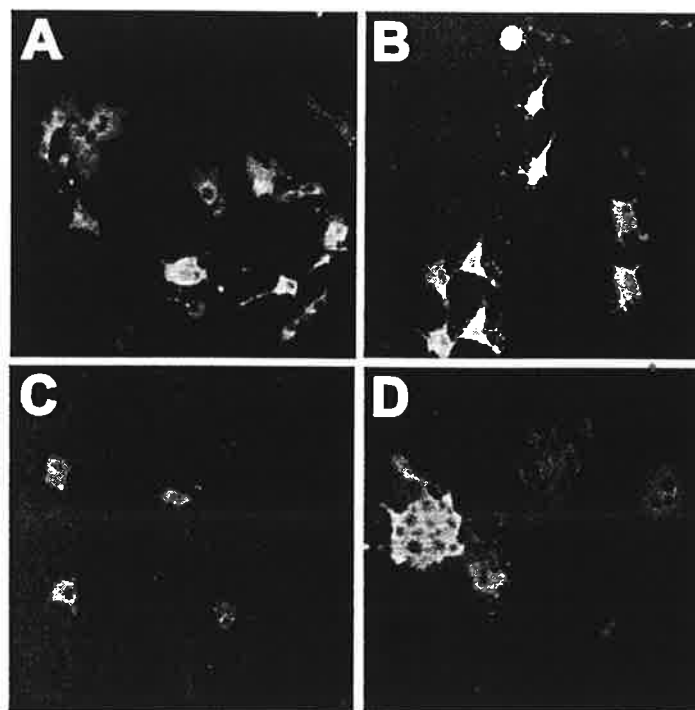


Fig. 3.2 : Validation du test de fusion de cellules transfectées. **A.** Formation de syncytia par des cellules infectées par le VTF7-3 (effet cytopathogène). **B.** Des cellules transfectées par un complexe calcium-ADN (P-GFP) ne fusionnent pas spontanément à pH 7,4. **C.** Cellules transfectées par un complexe calcium-ADN (G_{WT} + P-GFP) avant incubation à pH 5,8. **D.** Cellules transfectées par un complexe calcium-ADN (G_{WT} + P-GFP) après incubation à pH 5,8. (largeur du champ = 100 μ m)

1.2.2. Fusion de cellules transfectées sans virus de la vaccine

Le test décrit ci-dessus a été adapté à un protocole de transfection au phosphate de calcium (Parker et Stark, 1979). En l'absence du virus VTF7-3, le gène de G porté par le plasmide pcDNA1 n'est plus exprimé à partir du promoteur T7 mais à partir du promoteur CMV, plus faible. Pour tenir compte de ce changement, parce que la fusion membranaire dépend de la densité des protéines fusogènes, l'incubation à pH acide a été pratiquée 48 heures post-transfection au lieu de 24. Dans ces conditions, les cellules transfectées par le plasmide recombinant codant G fusionnent en de larges syncytia (**Fig. 3.2.D**) mais pas celles qui ont été transfectées avec le vecteur vide (**Fig. 3.2.B**).

Les différentes protéines G recombinantes décrites précédemment ont été testées par ce moyen. Les résultats présentés dans l'ensemble du chapitre 3 doivent être considérés comme préliminaires.

2. Mutagenèse du domaine TM

2.1. Rôle du domaine TM dans la fusion

Les protéines fusogènes interagissent avec deux membranes, par au moins deux régions distinctes. Le DTM est l'une d'entre elles. Le rôle du DTM dans la fusion est avéré par le fait que sa substitution par une ancre GPI inhibe la fusion membranaire. Ainsi GPI-HA, faite de l'ectodomaine de HA et d'une ancre GPI, est capable de provoquer la fusion des feuillettes externes mais pas celle des feuillettes internes (Kemble *et al.*, 1994). Dans le cas de la G du VSV, l'ancrage GPI abolit toute forme de fusion (Odell *et al.*, 1997).

Nous avons testé les capacités fusogéniques de **G_{GPI}** dans les mêmes conditions que **G_{WT}** et avons observé qu'elle est inactive (non montré). L'observation de la redistribution de la fluorescence de la P-GFP ne permet de voir que des événements de fusion complets. L'application d'un choc osmotique suffit à perturber un éventuel diaphragme d'hémifusion et faire basculer le système vers la fusion complète (Melikyan *et al.*, 1995). Nous avons donc fait suivre l'incubation à pH acide par un choc hypotonique. Ce choc n'a pas entraîné la redistribution de P-GFP dans les cellules voisines, ce qui

signifie que G_{GPI} est incapable de provoquer l'hémifusion (**Fig. 3.3**). Cette observation concorde avec les résultats publiés par Odell *et al.* (1997) à propos de la G_{GPI} du VSV. L'étude du repliement de l'ectodomaine (chapitre 1) permet d'expliquer ces données : l'ectodomaine de G_{GPI} est replié sous une forme alternative non fusogène.



Fig. 3.3 : Propriétés fusogènes de G_{GPI} .

Les cellules transfectées ont été incubées dans du MEM tamponné à pH 5,8 pendant 15' puis dans du PBS dilué trois fois pendant 30", puis réincubées dans du MEM (serum de verau 10%) pendant 3 heures avant d'être fixées et montées sous une lamelle. (largeur du champ = 100 μ m)

Il est reconnu que l'ancrage transmembranaire est nécessaire à une protéine fusogène pour mener la fusion à son terme. Nous avons toutefois noté que G_{1-461} , qui est constituée par l'ectodomaine de G et son DTM, à l'exception des résidus chargés qui le bordent en aval, est apparemment très faiblement fusogène (**Fig. 3.4.B**) alors que son repliement est natif (**Tab. 5**, p. 117).

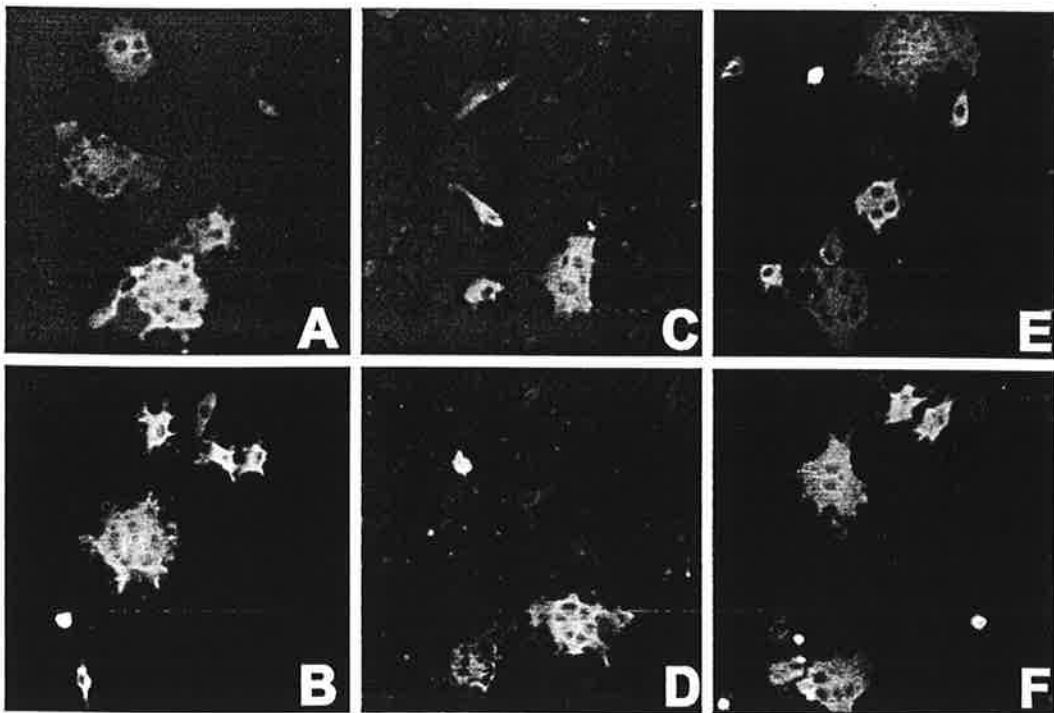


Fig. 3.4 : Propriétés fusogènes des chimères de G dont l'ancrage membranaire est modifié. A. G_{WT} . B. G_{1-461} . C. G_{p75} . D. G_{gC} . E. G_{GA-LL} . F. G_{C460G} . Les cellules ont été transfectées au $CaCl_2$. 48 heures après transfection, les cellules ont été brièvement incubées à pH 5,8 puis replacées à l'étuve. Elles ont été fixées au paraformaldéhyde (4%) 3 heures plus tard. (largeur du champ = 100 μ m)

2.2. Influence de la nature du DTM sur la fusion membranaire

Nous avons testé les constructions G_{p75} et G_{gC} et avons constaté que toutes les deux induisent la fusion, quoique moins efficacement que G_{WT} (**Fig. 3.4.C et D**). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Odell *et al.* (1997), qui avaient remplacé le DTM de la G du VSV par celui de protéines non fusogènes, et ont constaté que toutes les protéines chimères testées étaient fusogènes. Puisque ces DTM proviennent de protéines non fusogènes, il apparaît que, si la composition du DTM est soumise à une contrainte, celle-ci suffisamment subtile pour être satisfaite par des DTM choisis arbitrairement.

Cleverley et Lenard (1998) ont mis en évidence l'une de ces contraintes en montrant le rôle particulier des résidus glycyll du DTM dans la fusion membranaire provoquée par la G du VSV. Il est intéressant de remarquer que les séquences de DTM hétérologues choisies par Odell *et al.* (1997) contiennent toutes plusieurs résidus Gly. Le DTM de la G du VSV possède deux résidus Gly, et Cleverley et Lenard (1998) ont montré qu'un résidu de ce type est nécessaire et suffisant pour maintenir l'activité fusogène de G. L'analyse d'un échantillon de protéines virales, fusogènes ou non, leur a permis de constater que Gly est nettement surreprésenté dans le DTM des protéines fusogènes. Ils ont aussi observé un biais en faveur des résidus Met et Cys, ces deux résidus compensant peut-être l'absence de Gly dans les cas où il fait défaut.

G_{p75} et G_{gC} possèdent respectivement un et deux glycyll : elles se conforment donc aux résultats déjà publiés (Odell *et al.*, 1997 ; Cleverley et Lenard, 1998). Nous avons construit le mutant G_{GA-LL} , où trois résidus à faible encombrement (alanyl et glycyll) ont été remplacés chacun par un résidu leucyl (**Fig. 3.5.A**). L'ectodomaine de cette protéine se replie sous la forme N d'après les critères d'antigénicité (**Fig. 3.5.B**). Par ailleurs, G_{GA-LL} est fusogène (**Fig. 3.4.E**), contrairement à la G du VSV mutée dépourvue de Gly (Cleverley et Lenard, 1998).

Un autre débat porte sur le rôle de l'acylation des protéines fusogènes virales. Cette modification est en effet retrouvée chez un certain nombre d'entre elles, dont HA du virus influenza (Jin *et al.*, 1996 ; Fischer *et al.*, 1998). Le DTM de la G du VR aussi est acylé sur Cys₄₆₀ (Gaudin *et al.*, 1991). La protéine mutante G_{C460G} , dans laquelle Cys₄₆₀ est remplacé par Gly, se replie sous la forme N (non montré) et est fusogène (**Fig. 3.4.F**), ce qui indique que l'acylation en elle-même n'est pas nécessaire à la fusion. Ce résultat était attendu après le test de G_{p75} .

A

G_{WT} KYVLLSAGALTALMLIIFLMTCWR

G_{GGA-LL} KYVLLSLLALTLLMLIIFLMTCWR

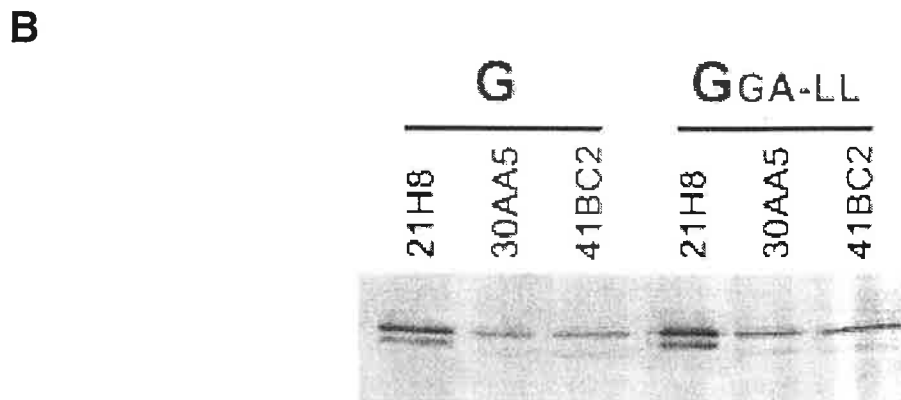


Fig. 3.5 : Caractérisation de G_{GGA-LL}. A. Séquence du DTM de G_{GGA-LL}. Les mutations qui différencient G_{GGA-LL} de G_{WT} sont soulignées. B. Antigénicité de G_{GGA-LL}. Après 10 minutes de marquage et 60 minutes de chasse, les cellules ont été lysées à froid dans du TD contenant 1% de CHAPS. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps indiqués.

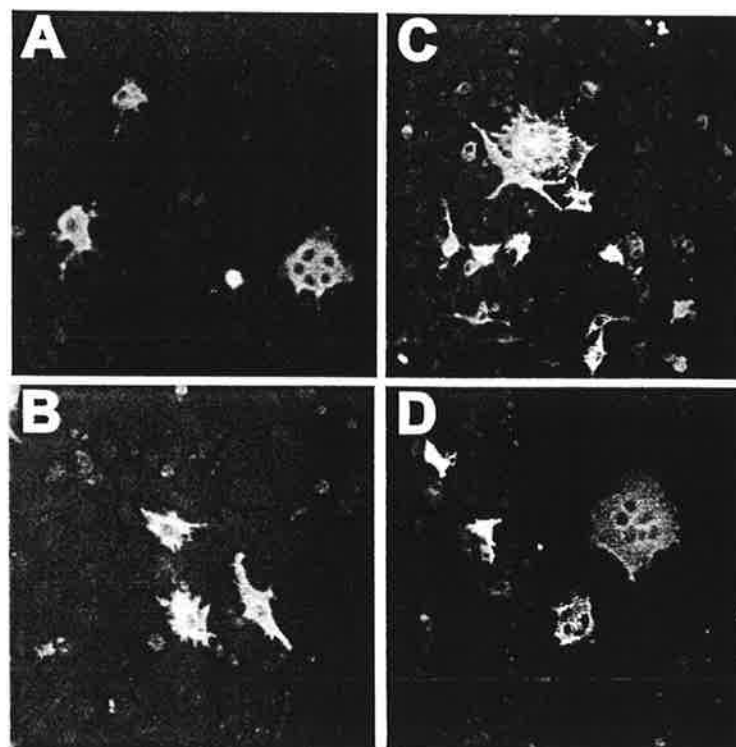


Fig. 3.6 : Propriétés fusogènes des chimères de G dont l'ancrage membranaire est modifié. A. GW437D. B. GGPITM. C. GP398G. D. GP398I. Les cellules ont été transfectées au CaCl₂. 48 heures après transfection, les cellules ont été brièvement incubées à pH 5,8 puis replacées à l'étuve pendant 3 heures avant d'être fixées. (largeur du champ = 100 μm)

l'expression virale (2.3.), car le VSV a servi de modèle pour l'ensemble des *Mononegavirales*.

La ressemblance évoquée est globale : elle n'empêche pas une divergence significative des séquences peptidiques. Par exemple, au sein même des Lyssavirus, les protéines les plus divergentes sont la phosphoprotéine et la glycoprotéine avec respectivement 47% et 58% de similarité entre les produits des géotypes les plus distants : PV et Mokola (Bourhy *et al.*, 1993 ; Tordo *et al.*, 1993). La divergence est plus forte encore au sein des Vésiculovirus (pour revue : Dietzschold *et al.*, 1996).

Enfin, il faut noter qu'en plus de la menace que les Lyssavirus font peser localement sur la santé publique, les Vésiculovirus et les Novirhabdovirus occasionnent des pertes économiques significatives en matière de production animale (pour revue : Wagner et Rose, 1996).

2.1.2 L'ordre des *Mononegavirales*

Le génome des Rhabdovirus est une molécule d'ARN. L'ARN génomique est fait d'un simple brin, complémentaire des ARN messagers. Sa polarité est donc négative : à ce titre les *Rhabdoviridae* font partie de l'ordre des *Mononegavirales* qui englobe aussi les *Paramyxoviridae* (virus Sendai), les *Bornaviridae* (virus de la maladie de Borna) et les *Filoviridae* (virus Ebola), dont le génome est également monopartite.

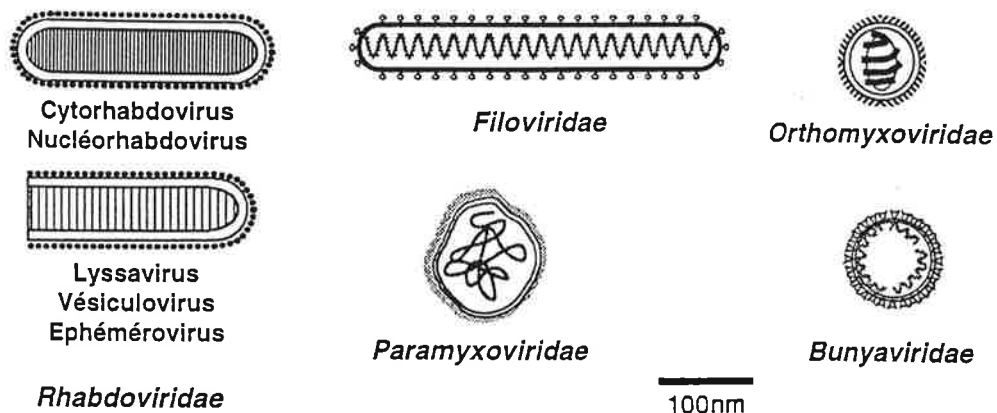


Fig. 2 : Morphologie des principaux virus à ARN simple brin de polarité négative. Les Lyssavirus sont susceptibles d'infecter tous les mammifères. Le spectre d'hôtes des Vésiculovirus comprend mammifères, poissons et arthropodes. Les Ephémérovirus infectent le bétail. Les Novirhabdovirus infectent les poissons. Les Nucléorhabdovirus et les Cytorhabdovirus infectent les plantes (pour revue : Dietzschold *et al.*, 1996). Les *Orthomyxoviridae* et les *Bunyaviridae* se distinguent des *Mononegavirales* par leur génome segmenté.

2.3. Importance de la connexion entre l'ectodomaine et le DTM

McNew *et al.* (1999) ont rapporté que l'insertion d'espaceurs flexibles de taille croissante entre le domaine cytoplasmique et le DTM des SNAREs entraîne une diminution progressive de l'efficacité de la fusion membranaire. Deux mutants produits par l'insertion de quelques résidus entre le DTM et l'ectodomaine ont été décrits dans le chapitre 1 : **G_{4G}** et **G_{GPITM}**. L'ectodomaine de ces deux protéines est replié sous la forme N et leurs propriétés fusogéniques ont été testées. Alors que G_{4G} provoque l'apparition de quelques syncytia (non montré), aucun syncytium n'a été observé parmi les cellules produisant G_{GPITM} (**Fig. 3.6.B**).

3. Mutagenèse de la région juxtamembranaire

3.1. Mutagenèse des résidus jouxtant le DTM

Les résultats de Robison et Whitt (2000) concernant le rôle des 12 résidus précédant le DTM de G dans le bourgeonnement du VSV suggèrent que la région juxtamembranaire de l'ectodomaine pourrait interagir avec la membrane.

Chez une autre protéine fusogène virale, la protéine Env du VIH, les 17 résidus précédant le DTM ont été impliqués dans l'assemblage viral et dans les propriétés fusogènes (Salzwedel *et al.*, 1999 ; Muñoz-Barroso *et al.*, 1999). Dans le cas de Env, des résidus hydrophobes conservés, en particulier des tryptophanyles, caractérisent la séquence de la région juxtamembranaire. Celle-ci pourrait adopter la structure d'une hélice amphipatique (Salzwedel *et al.*, 1999). Les résidus tryptophanyles ont la propriété de se placer préférentiellement à l'interface entre la membrane et le solvant aqueux (Braun et von Heijne, 1999 ; Ridder *et al.*, 2000).

La G des Rhabdovirus contient un seul tryptophanyl, Trp₄₃₇ chez le VR, parmi les résidus adjacents au DTM, dont la mutation affecte peu ou pas le repliement de G (chapitre 2). Nous avons donc testé les propriétés fusogéniques de G_{W437D} (chapitre 2). Nous avons déjà montré que l'ectodomaine de cette protéine se replie sous la forme native. Notre test a montré que la fusion provoquée par G_{W437D} est comparable à celle de G (**Fig. 3.6.A**).

3.2. Mutagenèse du motif His-Pro₃₉₇₋₃₉₈

La mutagenèse du motif His-Pro a été rapportée dans le chapitre 2, où nous avons montré que le repliement des mutants G_{P398G} et G_{P398I} est natif. Les propriétés fusogènes de ces mutants ont été testées : les mutants G_{P398G} et G_{P398I} provoquent l'apparition de quelques syncytia après incubation à pH 5,8 (**Fig. 3.6.C et D**). Si l'on se fie à ces observations préliminaires, la substitution de Ile ou Gly à Pro₃₉₈ n'empêche pas le repliement natif mais inhibe partiellement les propriétés de fusion (**Tab. 5**).

4. Conclusion

La caractérisation fonctionnelle de protéines chimères dont nous avons préalablement étudié le repliement, a permis d'examiner le rôle du DTM et de la région juxtamembranaire dans la fusion membranaire.

De nouvelles expériences devront être faites avant de tirer des conclusions précises des observations rapportées dans ce chapitre. En effet, une mesure quantitative des résultats de la fusion cellulaire est nécessaire. Il faudra pour cela mesurer la densité de G à la surface des cellules (par exemple après biotinylation ; Lisanti *et al.*, 1988) et la normaliser entre les différentes constructions. Il faudra aussi assurer une valeur statistique aux résultats obtenus.

Malgré ces réserves, comme en témoigne l'aptitude fusogénique de nombreux mutants dont la conformation est native, nous pouvons constater que l'ancre transmembranaire est très tolérante vis-à-vis de la mutagenèse (**Fig. 3.4**). Cela signifie que les critères satisfaits par la séquence du DTM sont soit redondants -l'effet d'une mutation serait compensé par le reste de la séquence-, soit peu spécifiques -beaucoup de séquences de DTM les rempliraient au moins partiellement tout en ayant été sélectionnées pour assumer une autre fonction.

La caractérisation du mutant G_{GA-LL} a montré qu'à la différence de la G du VSV (Cleverley et Lenard, 1998), la présence d'un résidu Gly dans le DTM de la G du VR n'est pas nécessaire à la fusion de cellules transfectées. La comparaison des résultats obtenus avec G_{p75}, G_{gC}, G_{C460G} et G_{GA-LL} à ceux de l'étude statistique de Cleverley et Lenard permet de s'interroger sur le rôle des résidus méthionyl et cystéinyl du DTM dans la fusion. Comme aucune hypothèse ne s'impose à propos du rôle

de ces résidus, une étude plus complète devra être entreprise afin de mettre en évidence la contribution éventuelle d'autres résidus que Gly, tels que Met₄₅₂, Met₄₅₈ et Cys₄₆₀.

L'effet de mutations dans la région juxtamembranaire a aussi été testé. Nous avons notamment montré que G_{GPITM} n'est pas fusogène dans les conditions utilisées, à la différence de G_{4G}, alors que toutes deux sont repliées sous la forme native. Ces résultats pourraient illustrer la nécessité d'une répercussion optimale des mouvements affectant différentes parties de l'ectodomaine jusqu'à l'ancre transmembranaire.

Nous avons remarqué que, dans les conditions où nous avons travaillé, aucune des protéines mutées ne fait fusionner les cellules aussi efficacement que G_{WT}, qu'il soit tenu compte du nombre des syncytia ou de leur taille. Ceci suggère que les mutations que nous avons présentées sont sanctionnées par une diminution de l'efficacité de la fusion membranaire. Cette observation devra être réexaminée après normalisation de la densité des protéines fusogènes à la surface des cellules transfectées. Une fois validées les conditions d'un test quantitatif, il sera possible de pousser plus loin l'étude de mutants comme G₁₋₄₆₁, G_{4G}, et G_{GPITM}, qui sont susceptibles de révéler l'importance de la fermeté de l'ancrage transmembranaire d'une part (les charges flanquant le DTM font défaut à G₁₋₄₆₁) et de l'ajustement de la charnière entre DTM et ectodomaine d'autre part.

Enfin les mutations du motif His-Pro₃₉₇₋₃₉₈ affectant peu ou pas le repliement de l'ectodomaine de G ont été testées. Elles sont peu nombreuses et, pour l'instant, ce travail ne peut être comparé à aucun autre : la discussion des données recueillies est donc spéculative. Nous la réservons pour la partie suivante, qui est une discussion générale axée sur la signification fonctionnelle éventuelle des résultats présentés dans ce manuscrit.

Tab. 5: Liste des protéines G mutantes présentées dans ce manuscrit. Structure IV = quaternaire.

Nom	Repliement - Antigenicité		Structure IV	Fusion	Apparition
G _{WT}	+++++	N	3	+	p. 70
G ₁₋₄₆₁	+++++	N	3	+	p. 70
G ₁₋₄₃₉	++++	I*	1		p. 70
G _{GPI}	++++	I*	1	-	p. 71
G _{p75}	+++++	N	1 / 3	+	p. 76
G _{gC}	+++++	N	3	+	p. 76
G _{iiGCN4b-e}	-				p. 78
G _{4GiiGCN4b-e}	-				p. 78
G _{4G}	+++++	N	1 / 3	+	p. 79
G _{GPITM}	++++	N	1	-	p. 81
G _{Ogd}	++++	I*	1	-	p. 81
G _{W437I}	++++	N			p. 102
G _{W437D}	++++	N		+	p. 102
G _{W437Y}	++++	N			p. 102
G _{ΔDEAED}	-				p. 103
G _{DEAFVEDE}	++	I*			p. 103
G _{PH}	+++	I*			p. 104
G _{H397K}	-				p. 105
G _{P398I}	++	N		(+)	p. 105
G _{P398G}	++	N		(+)	p. 105
G _{GA-LL}	+++++	N	3	+	p. 113
G _{ΔVDL-KYV}	+++	~N			p. 101
G _{ΔHER-KYV}	+++	N / I*			p. 101
G _{ΔKNG-KYV}	-				p. 101

Discussion

L'étude du repliement de l'ectodomaine de la glycoprotéine (G) du virus rabique (VR) à l'aide d'anticorps monoclonaux nous a permis de caractériser l'effet de l'ancrage membranaire sur la structure de G. Il ressort de ces travaux que la contribution du domaine transmembranaire (DTM) au repliement de l'ectodomaine consiste à assurer une distance minimale entre celui-ci et la membrane, avec laquelle il interagirait.

L'interaction entre l'ectodomaine de G et la membrane n'a pas été formellement démontrée dans ce travail mais cette hypothèse est soutenue par un ensemble de résultats que nous allons rappeler dans la suite. Les perspectives ouvertes par une telle hypothèse sur le repliement de G et sa fonction vont aussi être abordées.

Ce travail est essentiellement limité par le peu d'informations structurales disponibles sur la protéine G. La caractérisation conformationnelle de l'objet d'étude a été assurée par une batterie d'anticorps monoclonaux que nous avons choisis de façon à couvrir l'antigénicité de G le plus rationnellement possible. L'information conformationnelle est donc limitée aux sites antigéniques majeurs, qui ont été utilisés comme rapporteurs de la structure de l'ectodomaine (chapitre 1).

La deuxième partie de ce travail a été l'occasion de constater la difficulté de caractériser un peptide isolé de son contexte. La première difficulté est d'identifier l'environnement moléculaire des peptides étudiés. C'est ce qui a commencé à être fait au moyen du TFE, mais ces résultats devront être complétés par d'autres moyens qui ont déjà été évoqués (chapitre 2).

Hypothèse d'une interaction entre l'ectodomaine de G et la membrane.

L'interaction directe de l'ectodomaine de G avec la membrane est suggérée par l'influence de l'ancrage membranaire sur le repliement de G. En effet, cette influence dépend apparemment de la

distance entre l'ectodomaine et la membrane qui est imposée par le moyen d'ancrage. La possibilité d'une interaction avec un chaperon lui-même proche de la membrane a été discutée et écartée dans la conclusion du chapitre 1.

Par ailleurs, l'hypothèse d'une interaction avec la membrane est aussi appuyée par les résultats conjugués de Rolls *et al.* (1994) et de Robison et Whitt (2000). Ces derniers ont suggéré qu'une interaction directe entre la région juxtamembranaire et la membrane pourrait expliquer la contribution de la G du VSV au bourgeonnement des virions. Rolls *et al.* (1994) avaient étudié cette propriété et montré qu'elle se manifeste aussi dans le cas du VR, quoiqu'avec une efficacité moindre.

Durrer *et al.* (1995) ont circonscrit les régions de G au contact de la membrane cible avant et après la fusion. Pour ce faire, ils ont utilisé des sondes hydrophobes radioactives photoactivables afin de marquer les résidus de G interagissant avec la membrane. Ceux-ci ont été localisés après clivage de G au bromure de cyanogène en identifiant les peptides marqués ; l'identification des régions interagissant avec la membrane était donc limitée par la distribution des méthionines dans la protéine G. Le marquage dans les conditions de préfusion a permis à Durrer *et al.* (1995) de situer le peptide de fusion de la G du VR. Après fusion des deux membranes, d'autres fragments marqués ont été détectés : il s'agit des fragments 397-452 ou 397-458 ou 397-505. La présence du DTM suffit à expliquer le marquage de ces fragments, cependant il est possible que d'autres résidus compris entre His₃₉₇ et le DTM interagissent avec la membrane.

L'interaction entre l'ectodomaine et la membrane est donc une **hypothèse de travail** raisonnable. Sa nature et son rôle éventuel vont maintenant être discutés. Plusieurs questions restent en suspens concernant cette interaction : est-elle transitoire ou permanente? l'ectodomaine interagit-il avec un constituant membranaire spécifique? quels sont les résidus de G impliqués? Par ailleurs, l'une des fonctions de G étant d'interagir avec deux membranes et d'en assurer la fusion, il est nécessaire de discuter la signification fonctionnelle de toute interaction entre l'ectodomaine de G et la membrane.

Comment identifier les résidus de G qui interagiraient avec la membrane?

Plusieurs techniques peuvent être proposées pour caractériser une interaction entre la région juxtamembranaire et la membrane. Les travaux de Robison et Whitt (2000) ont suggéré que, chez le VSV, les 12 résidus juxtamembranaires en amont du DTM interagissent avec la membrane. Pour

valider cette hypothèse, la poursuite du travail de Durrer *et al.* (1995) en utilisant d'autres agents de clivage comme le N-chloro succinimide, qui coupe après les Trp, pourrait être envisagée.

Enfin, l'interaction entre la région juxtamembranaire et la membrane pourrait être étudiée par des techniques de biophysique dans un système d'interaction peptide - liposome. Les résultats de tels travaux pourraient être vérifiés en construisant de nouveaux mutants de la protéine G et en analysant leur repliement.

La membrane influence-t-elle la conformation de G de façon transitoire ou permanente?

L'effet de la membrane sur le repliement de diverses protéines a déjà été signalé (Grüner, 1985 ; Nicholas *et al.*, 1993 ; Riley *et al.*, 1997 ; Skórko-Glonek *et al.*, 1997 ; Bogdanov *et al.*, 1999). Les lipides membranaires sont susceptibles d'influencer le repliement d'une protéine membranaire de plusieurs façons (pour revue : Booth et Curran, 1999). L'effet est global lorsqu'il résulte par exemple des tensions associées à la morphologie des lipides (Grüner, 1985 ; Riley *et al.*, 1997). Dans un nombre croissant de cas, l'effet est spécifique d'un lipide qui peut contribuer à la structure finale (MacAuley *et al.*, 1999) ou bien jouer le rôle de chaperon (Bogdanov *et al.*, 1999).

L'extension de la notion de chaperon à d'autres molécules que des protéines a été discutée au cours des cinq dernières années (pour revues : Ellis, 1997 ; Bogdanov et Dowhan, 1999). L'équipe de William Dowhan a ainsi attribué le rôle de chaperon à la phosphatidyléthanolamine dans le repliement de la lactose-perméase d'*E. coli* (Bogdanov *et al.*, 1999). Cependant, la définition de chaperon spécifie que l'interaction est transitoire (pour revue : Ellis, 1997) et ceci est difficile à démontrer dans le cas de l'interaction entre un phospholipide et une protéine, aussi parle-t-on de repliement assisté par un lipide. Une autre façon pour la membrane d'influencer la structure d'une protéine est de fournir des lipides interagissant de façon stable avec la protéine. C'est par exemple le cas de la cardiolipine dans la structure cristallographique du centre photoréactionnel de *Rhodobacter sphaeroides* (MacAuley *et al.*, 1999). Ces deux exemples sont des protéines polytopiques. Skórko-Glonek *et al.* (1997) ont également mis en évidence la contribution du phosphatidylglycérol et de la cardiolipine à la structure d'une autre protéine d'*E. coli*, HtrA, qui est périphérique.

Dans le cas de G, on ne sait pas si l'intervention de la membrane est transitoire ou permanente. Pour clarifier le rôle de la membrane dans le repliement de l'ectodomaine de G, il faudrait pouvoir constater la permanence ou la réversibilité de son influence. Ceci peut être réalisé par exemple en comparant l'antigénicité de G₁₋₄₃₉ et celle d'une forme soluble de l'ectodomaine obtenue par protéolyse de la protéine complète, repliée sous la forme N. C'est ce que permet l'existence d'une forme soluble de l'ectodomaine de G, naturellement produite par protéolyse au cours de l'infection par le VR (Dietzschold *et al.*, 1983) : G_s. Dietzschold *et al.* (1983) ont rapporté que l'antigénicité de G_s est semblable à celle de G_{WT} cependant, l'utilisation de nos anticorps sur G_s dans des expériences préliminaires nous a montré qu'elle ne possède ni le site II, ni le site III. Il convient de reprendre la caractérisation de G_s pour pouvoir préciser si l'ectodomaine de G acquiert une antigénicité alternative par suite du clivage de G en G_s ou si G_s et son précurseur ont la même conformation. D'après nos résultats préliminaires, l'effet de la membrane -ou de l'environnement membranaire- sur la conformation de G pourrait être permanent.

Quelles seraient les conséquences fonctionnelles d'une influence permanente de la membrane sur la conformation de l'ectodomaine de G?

Gaudin *et al.* (1993) ont démontré que la fusion membranaire est liée à des réarrangements de la structure de la protéine G. Il est couramment admis que les réarrangements lipidiques qui conduisent à la fusion sont guidés par les réarrangements conformationnels affectant les protéines fusogènes. L'importance de la position relative du peptide de fusion et du DTM au cours de ces réarrangements a été abondamment commentée mais d'autres parties de ces protéines entrent en jeu (Bagai et Lamb, 1996 ; Muñoz-Barroso *et al.*, 1999). Réciproquement, les travaux présentés ici mettent en évidence une influence de la membrane sur la conformation de l'ectodomaine de G.

Trois conformations de G ont déjà été décrites (Gaudin *et al.*, 1993). Selon la température, la protonation de G entraîne la transition de N vers A, qui consiste en l'exposition du peptide de fusion, ou bien la transition de N vers I, qui provoque l'inactivation des propriétés fusogéniques. N et A sont antigéniquement similaires tandis que l'antigénicité de I se distingue par l'absence des sites II et III. En revanche, l'antigénicité de I et celle de la forme alternative que nous avons décrite, bien que différentes, se ressemblent.

La conformation N de G paraît être favorisée par la proximité de la membrane (chapitre 1). L'analyse du repliement de protéines chimériques où une telle interaction est défavorisée (G_{GPI} et G_{Ogd}) nous permet de suggérer que la destruction de cette interaction éventuelle orienterait le repliement vers une forme qui ressemble à I. Réciproquement, les réarrangements structuraux entraînés par la protonation de G pourraient compromettre l'interaction entre l'ectodomaine et la membrane, par exemple en la remplaçant par des interactions protéine-protéine.

Tout peptide, toute protéine interagissant avec une membrane est susceptible d'influencer sa structure, en particulier sa courbure (pour revues : Epanand *et al.*, 1995 ; Epanand et Epanand, 2001). Des considérations de ce type ont permis à Robison et Whitt (2000) de préciser quel rôle G pourrait avoir dans le bourgeonnement du VSV. L'hypothèse selon laquelle les changements de conformation de G induits à bas pH affectent aussi l'interaction de l'ectodomaine avec la membrane, implique que ces changements de conformation peuvent affecter la courbure de la membrane virale, donc jouer un rôle dans la fusion membranaire.

Rôle du motif His-Pro₃₉₇₋₃₉₈ dans la transition structurale induite à bas pH

Un motif His-Pro est conservé chez tous les Rhabdovirus, une quarantaine de résidus en amont du DTM. La région du motif His-Pro est impliquée dans la régulation du changement de conformation induit à bas pH (Gaudin *et al.*, 1996 ; Shokralla *et al.*, 1998).

La coïncidence du pK de l'équilibre entre N et I et de celui de l'histidine en solution permet de suggérer que l'histidinyl du motif His-Pro pourrait être sensible au pH de l'environnement du virion et participer à la régulation du changement de conformation (Gaudin *et al.*, 1996). Des travaux menés sur des pentapeptides modèles centrés sur Pro ont montré que la nature du résidu précédant Pro influence la cinétique de son isomérisation (Reimer *et al.*, 1997, 1998). Le cas du dipeptide His-Pro est particulièrement intéressant de ce point de vue car Reimer *et al.* ont montré que sous sa forme protonée, His catalyse l'isomérisation d'un Pro consécutif. L'ampleur de cet effet est différente selon le sens de la réaction, de sorte que l'équilibre d'isomérisation est également influencé.

La régulation de l'isomérisation de cette liaison peptidique par le pH dans le cas de G n'est encore qu'une hypothèse : cette hypothèse est corroborée par le fait que la permutation des deux

résidus ne compromettent pas le repliement mais l'orientent vers une forme alternative (chapitre 2). En effet à l'exception de la gêne stérique probablement modeste qui est occasionnée, la permutation touche la capacité de His₃₉₇ à influencer l'isomérisation de Pro₃₉₈ (Reimer *et al.*, 1997). Par contre, le fait que la mutation de Pro₃₉₈ en Ile ou en Gly n'a pas d'effet sensible dans les conditions de notre test de fusion, pourrait remettre en cause l'hypothèse évoquée. Notons cependant que Ile a été choisi pour sa ressemblance avec Pro, et Gly parce qu'il n'apporte qu'une contrainte stérique mineure ; de plus, l'isomérisation de la liaison peptidique a été mise en évidence pour d'autres résidus que Pro (pour revue : Eyles, 2001). Hormis la résolution de la structure de l'ectodomaine de G, obtenir des preuves directes de l'isomérisation éventuelle de Pro₃₉₈ dans l'ectodomaine de G paraît impossible... Il reste la possibilité d'effectuer certains contrôles en poursuivant le travail de mutagenèse. Bien que His₃₉₇ paraisse très sensible à la mutagenèse, l'étude systématique de Reimer *et al.* (1998) sur l'effet de la chaîne latérale du résidu en amont d'un prolyl sur l'isomérisation de ce dernier, pourrait guider la conception de nouveaux mutants dont l'antigénicité pourrait être caractérisée. Une telle étude permettra peut-être de comprendre ce qui a fait la spécificité de Pro dans la pression de sélection subie par le VR.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Allison, S.L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C. and Heinz, F.X. (1995) Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol*, **69**, 695-700.
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.
- Ashman, J.B. and Miller, J. (1999) A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain. *J Immunol*, **163**, 2704-2712.
- Asundi, V.K. and Carey, D.J. (1995) Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region. *J Biol Chem*, **270**, 26404-26410.
- Baer, G.M. and Cleary, W.F. (1972) A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. *J Infect Dis*, **125**, 520-527.
- Bagai, S. and Lamb, R. (1996) Truncation of the COOH-terminal region of the Paramyxovirus SV5 fusion protein leads to hemifusion, but not complete fusion. *J. Cell. Biol.*, **135**, 73-84.
- Baker, K.A., Dutch, R.E., Lamb, R.A. and Jardetzky, T.S. (1999) Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell*, **3**, 309-319.
- Balch, W.E. and Keller, D.S. (1986) ATP-coupled transport of vesicular stomatitis virus G protein. Functional boundaries of secretory compartments. *J Biol Chem*, **261**, 14690-14696.
- Ball, L.A. and White, C.N. (1976) Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 442-446.
- Baltimore, D., Huang, A.S. and Stampfer, M. (1970) Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus, II. An RNA polymerase in the virion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **66**, 572-576.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M. and Domingo, E. (2001) Evolution of cell recognition by viruses. *Science*, **292**, 1102-1105.
- Barge, A., Gaudin, Y., Coulon, P. and Ruigrok, R.W. (1993) Vesicular stomatitis virus M protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *J Virol*, **67**, 7246-7253.

- Beckes, J.D. and Perrault, J. (1992) Stepwise phosphorylation of vesicular stomatitis virus P protein by virion-associated kinases and uncoupling of second step from in vitro transcription. *Virology*, **188**, 606-617.
- Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A. and Lafay, F. (1991) Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol*, **65**, 4198-4203.
- Benmansour, A., Brahimi, M., Tuffereau, C., Coulon, P., Lafay, F. and Flamand, A. (1992) Rapid sequence evolution of street rabies glycoprotein is related to the highly heterogeneous nature of the viral population. *Virology*, **187**, 33-45.
- Bentz, J. (2000) Minimal aggregate size and minimal fusion unit for the first fusion pore of influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion. *Biophys J*, **78**, 227-245.
- Bergmann, J.E., Tokuyasu, K.T. and Singer, S.J. (1981) Passage of an integral membrane protein, the vesicular stomatitis virus glycoprotein, through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 1746-1750.
- Bergmann, J.E. and Fusco, P.J. (1988) The M protein of vesicular stomatitis virus associates specifically with the basolateral membranes of polarized epithelial cells independently of the G protein. *J Cell Biol*, **107**, 1707-1715.
- Biacchesi, S., Thoulouze, M.I., Bearzotti, M., Yu, Y.X. and Bremont, M. (2000) Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *J Virol*, **74**, 11247-11253.
- Bizebard, T., Gigant, B., Rigolet, P., Rasmussen, B., Diat, O., Bosecke, P., Wharton, S.A., Skehel, J.J. and Knossow, M. (1995) Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature*, **376**, 92-94.
- Black, B.L., Rhodes, R.B., McKenzie, M. and Lyles, D.S. (1993) The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *J Virol*, **67**, 4814-4821.
- Blondel, D., Harmison, G.G. and Schubert, M. (1990) Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *J Virol*, **64**, 1716-1725.
- Blough, H.A., Tiffany, J.M. and Aaslestad, H.G. (1977) Lipids of rabies virus and BHK-21 cell membranes. *J Virol*, **21**, 950-955.
- Blumberg, B.M., Leppert, M. and Kolakofsky, D. (1981) Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell*, **23**, 837-845.
- Blumberg, B.M., Giorgi, C. and Kolakofsky, D. (1983) N protein of vesicular stomatitis virus selectively encapsidates leader RNA in vitro. *Cell*, **32**, 559-567.

- Blumenthal, R., Sarkar, D.P., Durell, S., Howard, D.E. and Morris, S.J. (1996) Dilation of the influenza hemagglutinin pore revealed by the kinetics of individual cell-cell fusion events. *J. Cell Biol.*, **135**, 63-71.
- Bogdanov, M., Umeda, M. and Dowhan, W. (1999) Phospholipid-assisted refolding of an integral membrane protein. Minimum structural features for phosphatidylethanolamine to act as a molecular chaperone. *J Biol Chem*, **274**, 12339-12345.
- Bogdanov, M. and Dowhan, W. (1999) Lipid-assisted protein folding. *J Biol Chem*, **274**, 36827-36830.
- Bonatti, S., Migliaccio, G. and Simons, K. (1989) Palmitoylation of viral membrane glycoproteins takes place after exit from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **264**, 12590-12595.
- Booth, P.J. and Curran, A.R. (1999) Membrane protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 115-121.
- Bourhy, H., Kissi, B. and Tordo, N. (1993) Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology*, **194**, 70-81.
- Braun, P. and von Heijne, G. (1999) The aromatic residues Trp and Phe have different effects on the positioning of a transmembrane helix in the microsomal membrane. *Biochemistry*, **38**, 9778-9782.
- Bron, R., Wahlberg, J.M., Garoff, H. and Wilschut, J. (1993) Membrane fusion of Semliki Forest virus in a model system: correlation between fusion kinetics and structural changes in the envelope glycoprotein. *Embo J*, **12**, 693-701.
- Brosig, B. and Langosch, D. (1998) The dimerization motif of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci*, **7**, 1052-1056.
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1994) Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*, **371**, 37-43.
- Carneiro, F.A., Ferradosa, A.S. and Da Poian, A.T. (2001) Low pH-induced Conformational Changes in Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Involve Dramatic Structure Reorganization. *J Biol Chem*, **276**, 62-67.
- Carr, C.M. and Kim, P.S. (1993) A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell*, **73**, 823-832.
- Carr, C.M., Chaudhry, C. and Kim, P.S. (1997) Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14306-14313.
- Charlton, K.M. (1994) The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. *Curr Top Microbiol Immunol*, **187**, 95-119.
- Chen, J., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1999) N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8967-8972.

- Chenik, M., Chebli, K., Gaudin, Y. and Blondel, D. (1994) In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein. *J Gen Virol*, **75**, 2889-2896.
- Chenik, M., Chebli, K. and Blondel, D. (1995) Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism. *J Virol*, **69**, 707-712.
- Chenik, M., Schnell, M., Conzelmann, K.K. and Blondel, D. (1998) Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein. *J Virol*, **72**, 1925-1930.
- Chernomordik, L.V., Leikina, E., Frolov, V., Bronk, P. and Zimmerberg, J. (1997) An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemagglutinin depends upon membrane lipids. *J Cell Biol*, **136**, 81-93.
- Chernomordik, L.V., Frolov, V.A., Leikina, E., Bronk, P. and Zimmerberg, J. (1998) The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J Cell Biol*, **140**, 1369-1382.
- Chernomordik, L.V., Leikina, E., Kozlov, M.M., Frolov, V.A. and Zimmerberg, J. (1999) Structural intermediates in influenza haemagglutinin-mediated fusion. *Mol Membr Biol*, **16**, 33-42.
- Chevet, E., Wong, H.N., Gerber, D., Cochet, C., Fazel, A., Cameron, P.H., Gushue, J.N., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (1999) Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes. *Embo J*, **18**, 3655-3666.
- Chong, L.D. and Rose, J.K. (1993) Membrane association of functional vesicular stomatitis virus matrix protein in vivo. *J Virol*, **67**, 407-414.
- Chong, L.D. and Rose, J.K. (1994) Interactions of normal and mutant vesicular stomatitis virus matrix proteins with the plasma membrane and nucleocapsids. *J Virol*, **68**, 441-447.
- Chuang, J.L., Jackson, R.L. and Perrault, J. (1997) Isolation and characterization of vesicular stomatitis virus PolR revertants: polymerase readthrough of the leader-N gene junction is linked to an ATP-dependent function. *Virology*, **229**, 57-67.
- Clague, M.J., Schoch, C., Zech, L. and Blumenthal, R. (1990) Gating kinetics of pH-activated membrane fusion of vesicular stomatitis virus with cells: stopped-flow measurements by dequenching of octadecylrhodamine fluorescence. *Biochemistry*, **29**, 1303-1308.
- Clarke, D.K., Duarte, E.A., Moya, A., Elena, S.F., Domingo, E. and Holland, J. (1993) Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J Virol*, **67**, 222-228.

- Cleverley, D.Z. and Lenard, J. (1998) The transmembrane domain in viral fusion: Essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3425-3430.
- Cocquerel, L., Meunier, J.C., Pillez, A., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (1998) A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol*, **72**, 2183-2191.
- Cohen, F.S. and Melikyan, G.B. (1998) Methodologies in the study of cell-cell fusion. *METHODS: a companion to Methods in Enzymology*, **16**, 215-226.
- Constantinescu, S.N., Liu, X., Beyer, W., Fallon, A., Shekar, S., Henis, Y.I., Smith, S.O. and Lodish, H.F. (1999) Activation of the erythropoietin receptor by the gp55-P viral envelope protein is determined by a single amino acid in its transmembrane domain. *Embo J*, **18**, 3334-3347.
- Conzelmann, K.K. (1998) Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet*, **32**, 123-162.
- Coulon, P., Derbin, C., Kucera, P., Lafay, F., Prehaud, C. and Flamand, A. (1989) Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. *J Virol*, **63**, 3550-3554.
- Coulon, P., Deutsch, V., Lafay, F., Martinet-Edelist, C., Wyers, F., Herman, R.C. and Flamand, A. (1990) Genetic evidence for multiple functions of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J Gen Virol*, **71**, 991-996.
- Crimmins, D.L., Mehard, W.B. and Schlesinger, S. (1983) Physical properties of a soluble form of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus at neutral and acidic pH. *Biochemistry*, **22**, 5790-5796.
- Crise, B., Ruusala, A., Zagouras, P., Shaw, A. and Rose, J.K. (1989) Oligomerization of glycolipid-anchored and soluble forms of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J Virol*, **63**, 5328-5333.
- Czisch, M., Schleicher, M., Horger, S., Voelter, W. and Holak, T.A. (1993) Conformation of thymosin beta 4 in water determined by NMR spectroscopy. *Eur J Biochem*, **218**, 335-344.
- Das, T., Pattnaik, A.K., Takacs, A.M., Li, T., Hwang, L.N. and Banerjee, A.K. (1997) Basic amino acid residues at the carboxy-terminal eleven amino acid region of the phosphoprotein (P) are required for transcription but not for replication of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology*, **238**, 103-114.
- Das, T., Mathur, M., Gupta, A.K., Janssen, G.M. and Banerjee, A.K. (1998) RNA polymerase of vesicular stomatitis virus specifically associates with translation elongation factor-1 alphabeta for its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1449-1454.
- David, V., Hochstenbach, F., Rajagopalan, S. and Brenner, M.B. (1993) Interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmic reticulum suggests a chaperone function for human integral membrane protein IP90 (calnexin). *J Biol Chem*, **268**, 9585-9592.

- De, B.P., Thornton, G.B., Luk, D. and Banerjee, A.K. (1982) Purified matrix protein of vesicular stomatitis virus blocks viral transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 7137-7141.
- De, B.P. and Banerjee, A.K. (1985) Requirements and functions of vesicular stomatitis virus L and NS proteins in the transcription process in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **126**, 40-49.
- de Silva, A.M., Balch, W.E. and Helenius, A. (1990) Quality control in the endoplasmic reticulum: folding and misfolding of vesicular stomatitis virus G protein in cells and in vitro. *J Cell Biol*, **111**, 857-866.
- de Silva, A., Braakman, I. and Helenius, A. (1993) Posttranslational folding of vesicular stomatitis virus G protein in the ER: involvement of noncovalent and covalent complexes. *J Cell Biol*, **120**, 647-655.
- Degen, E., Cohen-Doyle, M.F. and Williams, D.B. (1992) Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both beta 2- microglobulin and peptide. *J Exp Med*, **175**, 1653-1661.
- Desmeziers, E., Jacob, Y., Saron, M.F., Delpyroux, F., Tordo, N. and Perrin, P. (1999) Lyssavirus glycoproteins expressing immunologically potent foreign B cell and cytotoxic T lymphocyte epitopes as prototypes for multivalent vaccines. *J Gen Virol*, **80**, 2343-2351.
- Dietzschold, B., Wiktor, T.J., Wunner, W.H. and Varrichio, A. (1983a) Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virology*, **124**, 330-337.
- Dietzschold, B., Wunner, W.H., Wiktor, T.J., Lopes, A.D., Lafon, M., Smith, C.L. and Koprowski, H. (1983b) Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 70-74.
- Dietzschold, B., Wiktor, T.J., Trojanowski, J.Q., Macfarlan, R.I., Wunner, W.H., Torres-Anjel, M.J. and Koprowski, H. (1985) Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. *J Virol*, **56**, 12-18.
- Dietzschold, B., Wang, H.H., Rupprecht, C.E., Celis, E., Tollis, M., Ertl, H., Heber-Katz, E. and Koprowski, H. (1987) Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 9165-9169.
- Dietzschold, B., Rupprecht, C.E., Fu, Z.F. and Koprowski, H. (1996) Rhabdoviruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott - Raven, Philadelphia, pp. 1137-1160.
- Doms, R.W., Keller, D.S., Helenius, A. and Balch, W.E. (1987) Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *J Cell Biol*, **105**, 1957-1969.
- Doms, R.W., Lamb, R.A., Rose, J.K. and Helenius, A. (1993) Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology*, **193**, 545-562.

- Drickamer, K. and Taylor, M.E. (1998) Evolving views of protein glycosylation. *Trends Biochem Sci*, **23**, 321-324.
- Drings, A., Jallet, C., Chambert, B., Tordo, N. and Perrin, P. (1999) Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? *Vaccine*, **17**, 1549-1557.
- Durrer, P., Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., Graf, R. and Brunner, J. (1995) Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. *J Biol Chem*, **270**, 17575-17581.
- Eigen, M. (1996) On the nature of virus quasispecies. *Trends Microbiol*, **4**, 216-218.
- Einer-Jensen, K., Krogh, T.N., Roepstorff, P. and Lorenzen, N. (1998) Characterization of intramolecular disulfide bonds and secondary modifications of the glycoprotein from viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *J Virol*, **72**, 10189-10196.
- Ellgaard, L., Molinari, M. and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, **286**, 1882-1888.
- Ellis, R.J. (1997) Do molecular chaperones have to be proteins? *Biochem Biophys Res Commun*, **238**, 687-692.
- Emerson, S.U. and Wagner, R.R. (1972) Dissociation and reconstitution of the transcriptase and template activities of vesicular stomatitis B and T virions. *J Virol*, **10**, 297-309.
- Emerson, S.U. and Yu, Y. (1975) Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus. *J Virol*, **15**, 1348-1356.
- Emerson, S.U. (1982) Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome. *Cell*, **31**, 635-642.
- Enserink, M. (2000) Searching for the mark of Cain. *Science*, **289**, 575-579.
- Epand, R.M., Shai, Y., Segrest, J.P. and Anantharamaiah, G.M. (1995) Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. *Biopolymers*, **37**, 319-338.
- Epand, R.M. and Epand, R.F. (2000) Modulation of membrane curvature by peptides. *Biopolymers*, **55**, 358-363.
- Eyles, S.J. (2001) Proline not the only culprit? *Nat Struct Biol*, **8**, 380-381.
- Fass, D., Harrison, S.C. and Kim, P.S. (1996) Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nat Struct Biol*, **3**, 465-469.
- Finke, S. and Conzelmann, K.K. (1997) Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions. *J Virol*, **71**, 7281-7288.

- Finke, S., Cox, J.H. and Conzelmann, K.K. (2000) Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene. *J Virol*, **74**, 7261-7269.
- Fischer, C., Schroth-Diez, B., Herrmann, A., Garten, W. and Klenk, H.D. (1998) Acylation of the influenza hemagglutinin modulates fusion activity. *Virology*, **248**, 284-294.
- Flamand, A., Delagneau, J.F. and Bussereau, F. (1978) An RNA polymerase activity in purified rabies virions. *J Gen Virol*, **40**, 233-238.
- Flamand, A., Raux, H., Gaudin, Y. and Ruigrok, R.W. (1993) Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology*, **194**, 302-313.
- Flamand, A., Babic, N. and Coulon, P. (1998) Bases moléculaires du neurotropisme viral (rage et pseudo-rage). *Virologie*, **2**, 52-56.
- Flanagan, E.B., Ball, L.A. and Wertz, G.W. (2000) Moving the glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus to promoter-proximal positions accelerates and enhances the protective immune response. *J Virol*, **74**, 7895-7902.
- Flanagan, E.B., Zamparo, J.M., Ball, L.A., Rodriguez, L.L. and Wertz, G.W. (2001) Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *J Virol*, **75**, 6107-6114.
- Fredericksen, B.L. and Whitt, M.A. (1996) Mutations at two conserved acidic amino acids in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect pH-dependent conformational changes and reduce the pH threshold for membrane fusion. *Virology*, **217**, 49-57.
- Fredericksen, B.L. and Whitt, M.A. (1998) Attenuation of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding mutant glycoproteins demonstrate a critical role for maintaining a high pH threshold for membrane fusion in viral fitness. *Virology*, **240**, 349-358.
- Frydman, J. (2001) FOLDING OF NEWLY TRANSLATED PROTEINS IN VIVO: The Role of Molecular Chaperones. *Annu Rev Biochem*, **70**, 603-647.
- Fuerst, T.R., Niles, E.G., Studier, F.W. and Moss, B. (1986) Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8122-8126.
- Gallione, C.J. and Rose, J.K. (1985) A single amino acid substitution in a hydrophobic domain causes temperature-sensitive cell-surface transport of a mutant viral glycoprotein. *J Virol*, **54**, 374-382.
- Gao, Y. and Lenard, J. (1995) Cooperative binding of multimeric phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus to polymerase (L) and template: pathways of assembly. *J Virol*, **69**, 7718-7723.

- Gao, Y. and Lenard, J. (1995) Multimerization and transcriptional activation of the phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus by casein kinase-II. *Embo J*, **14**, 1240-1247.
- Gao, Y., Greenfield, N.J., Cleverley, D.Z. and Lenard, J. (1996) The transcriptional form of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is a trimer: structure and stability. *Biochemistry*, **35**, 14569-14573.
- Gastka, M., Horvath, J. and Lentz, T.L. (1996) Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. *J Gen Virol*, **77**, 2437-2440.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Benmansour, A. and Flamand, A. (1991a) Fatty acylation of rabies virus proteins. *Virology*, **184**, 441-444.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Segretain, D., Knossow, M. and Flamand, A. (1991b) Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J Virol*, **65**, 4853-4859.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., Tuffereau, C., Knossow, M. and Flamand, A. (1992) Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology*, **187**, 627-632.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., Knossow, M. and Flamand, A. (1993) Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol*, **67**, 1365-1372.
- Gaudin, Y., Barge, A., Ebel, C. and Ruigrok, R.W. (1995a) Aggregation of VSV M protein is reversible and mediated by nucleation sites: implications for viral assembly. *Virology*, **206**, 28-37.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Flamand, A. and Ruigrok, R.W. (1995b) Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. *J Virol*, **69**, 5528-5534.
- Gaudin, Y., Raux, H., Flamand, A. and Ruigrok, R.W. (1996) Identification of amino acids controlling the low-pH-induced conformational change of rabies virus glycoprotein. *J Virol*, **70**, 7371-7378.
- Gaudin, Y. (1997a) Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *J Virol*, **71**, 3742-3750.
- Gaudin, Y., Sturgis, J., Doumith, M., Barge, A., Robert, B. and Ruigrok, R.W. (1997b) Conformational flexibility and polymerization of vesicular stomatitis virus matrix protein. *J Mol Biol*, **274**, 816-825.
- Gaudin, Y., de Kinkelin, P. and Benmansour, A. (1999a) Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. *J Gen Virol*, **80**, 1221-1229.

- Gaudin, Y., Moreira, S., Benejean, J., Blondel, D., Flamand, A. and Tuffereau, C. (1999b) Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. *J Gen Virol*, **80**, 1647-1656.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Brunner, J., Flamand, A. and Ruigrok, R. (1999c) Rabies virus-induced membrane fusion. *Mol Membr Biol*, **16**, 21-31.
- Gaudin, Y. (2000) Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *J Cell Biol*, **150**, 601-612.
- Gerlier, D. (1998) Entrée des virus enveloppés à l'échelle moléculaire. *Virologie*, **2**, 215-226.
- Gibson, R., Schlesinger, S. and Kornfeld, S. (1979) The nonglycosylated glycoprotein of vesicular stomatitis virus is temperature-sensitive and undergoes intracellular aggregation at elevated temperatures. *J Biol Chem*, **254**, 3600-3607.
- Gibson, R., Kornfeld, S. and Schlesinger, S. (1981) The effect of oligosaccharide chains of different sizes on the maturation and physical properties of the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem*, **256**, 456-462.
- Gigant, B., Iseni, F., Gaudin, Y., Knossow, M. and Blondel, D. (2000) Neither phosphorylation nor the amino-terminal part of rabies virus phosphoprotein is required for its oligomerization. *J Gen Virol*, **81 Pt 7**, 1757-1761.
- Gillece, P., Luz, J.M., Lennarz, W.J., de La Cruz, F.J. and Romisch, K. (1999) Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol*, **147**, 1443-1456.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. and Ruyschaert, J.M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell Biochem*, **23**, 405-450.
- Gottlieb, T.A., Gonzalez, A., Rizzolo, L., Rindler, M.J., Adesnik, M. and Sabatini, D.D. (1986) Sorting and endocytosis of viral glycoproteins in transfected polarized epithelial cells. *J Cell Biol*, **102**, 1242-1255.
- Gruner, S.M. (1985) Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 3665-3669.
- Gupta, A.K. and Banerjee, A.K. (1997) Expression and purification of vesicular stomatitis virus N-P complex from *Escherichia coli*: role in genome RNA transcription and replication in vitro. *J Virol*, **71**, 4264-4271.
- Gupta, A.K., Blondel, D., Choudhary, S. and Banerjee, A.K. (2000) The phosphoprotein of rabies virus is phosphorylated by a unique cellular protein kinase and specific isomers of protein kinase C. *J Virol*, **74**, 91-98.

- Hammond, C., Braakman, I. and Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 913-917.
- Hammond, C. and Helenius, A. (1994a) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol*, **126**, 41-52.
- Hammond, C. and Helenius, A. (1994b) Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science*, **266**, 456-458.
- Hampl, H., Ben-Porat, T., Ehrlicher, L., Habermehl, K.O. and Kaplan, A.S. (1984) Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus. *J Virol*, **52**, 583-590.
- Harbury, P.B., Zhang, T., Kim, P.S. and Alber, T. (1993) A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science*, **262**, 1401-1407.
- Harty, R.N., Paragas, J., Sudol, M. and Palese, P. (1999) A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *J Virol*, **73**, 2921-2929.
- Heinz, F.X. and Allison, S.L. (2000) Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res*, **55**, 231-269.
- Herrmann, A., Clague, M.J., Puri, A., Morris, S.J., Blumenthal, R. and Grimaldi, S. (1990) Effect of erythrocyte transbilayer phospholipid distribution on fusion with vesicular stomatitis virus. *Biochemistry*, **29**, 4054-4058.
- Hochstenbach, F., David, V., Watkins, S. and Brenner, M.B. (1992) Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T- and B-cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during their assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4734-4738.
- Howard, M. and Wertz, G. (1989) Vesicular stomatitis virus RNA replication: a role for the NS protein. *J Gen Virol*, **70**, 2683-2694.
- Huang, K.S., Bayley, H., Liao, M.J., London, E. and Khorana, H.G. (1981) Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J Biol Chem*, **256**, 3802-3809.
- Hummeler, K., Koprowski, H. and Wiktor, T.J. (1967) Structure and development of rabies virus in tissue culture. *J Virol*, **1**, 152-170.
- Hwang, L.N., Englund, N., Das, T., Banerjee, A.K. and Pattnaik, A.K. (1999) Optimal replication activity of vesicular stomatitis virus RNA polymerase requires phosphorylation of a residue(s) at carboxy-terminal domain II of its accessory subunit, phosphoprotein P. *J Virol*, **73**, 5613-5620.

- Ihara, Y., Cohen-Doyle, M.F., Saito, Y. and Williams, D.B. (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Mol Cell*, **4**, 331-341.
- Izeni, F., Barge, A., Baudin, F., Blondel, D. and Ruigrok, R.W. (1998) Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol*, **79**, 2909-2919.
- Izeni, F., Baudin, F., Blondel, D. and Ruigrok, R.W. (2000) Structure of the RNA inside the vesicular stomatitis virus nucleocapsid. *Rna*, **6**, 270-281.
- Iverson, L.E. and Rose, J.K. (1981) Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell*, **23**, 477-484.
- Jackson, A.C. and Rossiter, J.P. (1997) Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection. *J Virol*, **71**, 5603-5607.
- Jacob, Y., Badrane, H., Ceccaldi, P.E. and Tordo, N. (2000) Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J Virol*, **74**, 10217-10222.
- Jallet, C., Jacob, Y., Bahloul, C., Drings, A., Desmezieres, E., Tordo, N. and Perrin, P. (1999) Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential. *J Virol*, **73**, 225-233.
- Jayakar, H.R., Murti, K.G. and Whitt, M.A. (2000) Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release. *J Virol*, **74**, 9818-9827.
- Jiang, S., Lin, K., Strick, N. and Neurath, A.R. (1993) Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein GP41. *Biochem Biophys Res Commun*, **195**, 533-538.
- Jin, H., Subbarao, K., Bagai, S., Leser, G.P., Murphy, B.R. and Lamb, R.A. (1996) Palmitoylation of the influenza virus hemagglutinin (H3) is not essential for virus assembly or infectivity. *J Virol*, **70**, 1406-1414.
- Kammerer, R.A., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Engel, J., Aebi, U. and Steinmetz, M.O. (1998) An autonomous folding unit mediates the assembly of two-stranded coiled coils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13419-13424.
- Kemble, G.W., Danieli, T. and White, J.M. (1994) Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell*, **76**, 383-391.
- Kim, P.S. and Baldwin, R.L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem*, **59**, 631-660.
- Kissi, B., Badrane, H., Audry, L., Lavenu, A., Tordo, N., Brahimi, M. and Bourhy, H. (1999) Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. *J Gen Virol*, **80**, 2041-2050.

- Knipe, D.M., Baltimore, D. and Lodish, H.F. (1977) Maturation of viral proteins in cells infected with temperature- sensitive mutants of vesicular stomatitis virus. *J Virol*, **21**, 1149-1158.
- Kobe, B., Center, R.J., Kemp, B.E. and Pountourios, P. (1999) Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4319-4324.
- Kouznetzoff, A., Buckle, M. and Tordo, N. (1998) Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. *J Gen Virol*, **79**, 1005-1013.
- Kozlov, M.M. and Chernomordik, L.V. (1998) A mechanism of protein-mediated fusion: coupling between refolding of the influenza hemagglutinin and lipid rearrangements. *Biophys J*, **75**, 1384-1396.
- Kucera, P., Dolivo, M., Coulon, P. and Flamand, A. (1985) Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. *J Virol*, **55**, 158-162.
- Lafay, F. (1974) Envelope proteins of vesicular stomatitis virus: effect of temperature- sensitive mutations in complementation groups III and V. *J Virol*, **14**, 1220-1228.
- Lafay, F., Coulon, P., Astic, L., Saucier, D., Riche, D., Holley, A. and Flamand, A. (1991) Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. *Virology*, **183**, 320-330.
- Lafay, F., Benmansour, A., Chebli, K. and Flamand, A. (1996) Immunodominant epitopes defined by a yeast-expressed library of random fragments of the rabies virus glycoprotein map outside major antigenic sites. *J Gen Virol*, **77**, 339-346.
- Langosch, D. and Heringa, J. (1998) Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins*, **31**, 150-159.
- Le Mercier, P., Jacob, Y. and Tordo, N. (1997) The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA- dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*, **78**, 1571-1576.
- Leavitt, R., Schlesinger, S. and Kornfeld, S. (1977) Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of Sindbis and vesicular stomatitis viruses. *J Virol*, **21**, 375-385.
- Ledesma, M.D., Simons, K. and Dotti, C.G. (1998) Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3966-3971.
- Lee, J. and Lentz, B.R. (1998) Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9274-9279.
- Lentz, T.L., Wilson, P.T., Hawrot, E. and Speicher, D.W. (1984) Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. *Science*, **226**, 847-848.

- Lescar, J., Roussel, A., Wien, M.W., Navaza, J., Fuller, S.D., Wengler, G. and Rey, F.A. (2001) The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*, **105**, 137-148.
- Li, Y., Drone, C., Sat, E. and Ghosh, H.P. (1993a) Mutational analysis of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G for membrane fusion domains. *J Virol*, **67**, 4070-4077.
- Li, Y., Luo, L., Schubert, M., Wagner, R.R. and Kang, C.Y. (1993b) Viral liposomes released from insect cells infected with recombinant baculovirus expressing the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol*, **67**, 4415-4420.
- Lisanti, M.P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A.R. and Rodriguez-Boulan, E. (1988) Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9557-9561.
- Lodish, H.F. and Kong, N. (1990) Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **265**, 10893-10899.
- Luan, P., Yang, L. and Glaser, M. (1995) Formation of membrane domains created during the budding of vesicular stomatitis virus. A model for selective lipid and protein sorting in biological membranes. *Biochemistry*, **34**, 9874-9883.
- Lupas, A. (1997) Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 388-393.
- Lyles, D.S., McKenzie, M. and Parce, J.W. (1992) Subunit interactions of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral matrix protein. *J Virol*, **66**, 349-358.
- Lyles, D.S., McKenzie, M.O., Kaptur, P.E., Grant, K.W. and Jerome, W.G. (1996) Complementation of M gene mutants of vesicular stomatitis virus by plasmid-derived M protein converts spherical extracellular particles into native bullet shapes. *Virology*, **217**, 76-87.
- Lyles, D.S. (2000) Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 709-724.
- Machamer, C.E., Florkiewicz, R.Z. and Rose, J.K. (1985) A single N-linked oligosaccharide at either of the two normal sites is sufficient for transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface. *Mol Cell Biol*, **5**, 3074-3083.
- Machamer, C.E. and Rose, J.K. (1988) Vesicular stomatitis virus G proteins with altered glycosylation sites display temperature-sensitive intracellular transport and are subject to aberrant intermolecular disulfide bonding. *J Biol Chem*, **263**, 5955-5960.
- Machamer, C.E. and Rose, J.K. (1988) Influence of new glycosylation sites on expression of the vesicular stomatitis virus G protein at the plasma membrane. *J Biol Chem*, **263**, 5948-5954.

- Machamer, C.E., Doms, R.W., Bole, D.G., Helenius, A. and Rose, J.K. (1990) Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. *J Biol Chem*, **265**, 6879-6883.
- Mackenzie, K.R., Prestegard, J.H. and Engelman, D.M. (1997) A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science*, **276**, 131-133.
- Manavalan, P. and Johnson, W.C., Jr. (1987) Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal Biochem*, **167**, 76-85.
- Margolese, L., Waneck, G.L., Suzuki, C.K., Degen, E., Flavell, R.A. and Williams, D.B. (1993) Identification of the region on the class I histocompatibility molecule that interacts with the molecular chaperone, p88 (calnexin, IP90). *J Biol Chem*, **268**, 17959-17966.
- Markosyan, R.M., Melikyan, G.B. and Cohen, F.S. (1999) Tension of membranes expressing the hemagglutinin of influenza virus inhibits fusion. *Biophys J*, **77**, 943-952.
- Markosyan, R.M., Cohen, F.S. and Melikyan, G.B. (2000) The lipid-anchored ectodomain of influenza virus hemagglutinin (GPI-HA) is capable of inducing nonenlarging fusion pores. *Mol Biol Cell*, **11**, 1143-1152.
- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A. and Simons, K. (1982) Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J Mol Biol*, **156**, 609-631.
- McAuley, K.E., Fyfe, P.K., Ridge, J.P., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J. and Jones, M.R. (1999) Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14706-14711.
- McNew, J.A., Weber, T., Engelman, D.M., Sollner, T.H. and Rothman, J.E. (1999) The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNARE-dependent fusion. *Mol Cell*, **4**, 415-421.
- Mebatsion, T., Konig, M. and Conzelmann, K.K. (1996) Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell*, **84**, 941-951.
- Mebatsion, T., Weiland, F. and Conzelmann, K.K. (1999) Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol*, **73**, 242-250.
- Melikyan, G.B., White, J.M. and Cohen, F.S. (1995) GPI-anchored influenza hemagglutinin induces hemifusion to both red blood cell and planar bilayer membranes. *J Cell Biol*, **131**, 679-691.
- Melikyan, G.B., Lin, S., Roth, M.G. and Cohen, F.S. (1999) Amino acid sequence requirements of the transmembrane and cytoplasmic domains of influenza virus hemagglutinin for viable membrane fusion. *Mol Biol Cell*, **10**, 1821-1836.

- Melikyan, G.B., Markosyan, R.M., Hemmati, H., Delmedico, M.K., Lambert, D.M. and Cohen, F.S. (2000) Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol*, **151**, 413-423.
- Mellon, M.G. and Emerson, S.U. (1978) Rebinding of transcriptase components (L and NS proteins) to the nucleocapsid template of vesicular stomatitis virus. *J Virol*, **27**, 560-567.
- Metsikkö, K. and Simons, K. (1986) The budding mechanism of spikeless vesicular stomatitis virus particles. *Embo J*, **5**, 1913-1920.
- Metsikkö, K., van Meer, G. and Simons, K. (1986) Reconstitution of the fusogenic activity of vesicular stomatitis virus. *Embo J*, **5**, 3429-3435.
- Molinari, M. and Helenius, A. (2000) Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science*, **288**, 331-333.
- Morimoto, K., Ni, Y.J. and Kawai, A. (1992) Syncytium formation is induced in the murine neuroblastoma cell cultures which produce pathogenic type G proteins of the rabies virus. *Virology*, **189**, 203-216.
- Moyer, S.A., Smallwood-Kentro, S., Haddad, A. and Prevec, L. (1991) Assembly and transcription of synthetic vesicular stomatitis virus nucleocapsids. *J Virol*, **65**, 2170-2178.
- Muñoz-Barroso, I., Durell, S., Sakaguchi, K., Appella, E. and Blumenthal, R. (1998) Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41. *J Cell Biol*, **140**, 315-323.
- Muñoz-Barroso, I., Salzwedel, K., Hunter, E. and Blumenthal, R. (1999) Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J Virol*, **73**, 6089-6092.
- Murphy, F.A., Bauer, S.P., Harrison, A.K. and Winn, W.C. (1973a) Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. *Lab Invest*, **28**, 361-376.
- Murphy, F.A., Harrison, A.K., Winn, W.C. and Bauer, S.P. (1973b) Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses: infection of the central nervous system and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. *Lab Invest*, **29**, 1-16.
- Murphy, F.A. and Bauer, S.P. (1974) Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system. *Intervirology*, **3**, 256-268.
- Musch, A., Xu, H., Shields, D. and Rodriguez-Boulan, E. (1996) Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J Cell Biol*, **133**, 543-558.

- Najbar, L.V., Craik, D.J., Wade, J.D., Salvatore, D. and McLeish, M.J. (1997) Conformational analysis of LYS(11-36), a peptide derived from the beta- sheet region of T4 lysozyme, in TFE and SDS. *Biochemistry*, **36**, 11525-11533.
- Nakahara, K., Ohnuma, H., Sugita, S., Yasuoka, K., Nakahara, T., Tochikura, T.S. and Kawai, A. (1999) Intracellular behavior of rabies virus matrix protein (M) is determined by the viral glycoprotein (G). *Microbiol Immunol*, **43**, 259-270.
- Nathanson, N. and Gonzales-Scarano. (1991) Immune response to rabies virus. In Baer, G.M. (ed.) *The natural history of rabies*, pp. 135-161.
- Newcomb, W.W. and Brown, J.C. (1981) Role of the vesicular stomatitis virus matrix protein in maintaining the viral nucleocapsid in the condensed form found in native virions. *J Virol*, **39**, 295-299.
- Nicholas, R.A., Lamson, D.R. and Schultz, D.E. (1993) Penicillin-binding protein 1B from *Escherichia coli* contains a membrane association site in addition to its transmembrane anchor. *J Biol Chem*, **268**, 5632-5641.
- Nussbaum, O., Broder, C.C. and Berger, E.A. (1994) Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. *J Virol*, **68**, 5411-5422.
- Odell, E.W., Yan, J. and Ghosh, H.P. (1997) Influence of membrane anchoring and cytoplasmic domains on the fusogenic activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *J. Virol.*, **71**, 7996-8000.
- Oliver, J.D., van der Wal, F.J., Bulleid, N.J. and High, S. (1997) Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science*, **275**, 86-88.
- Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H. and High, S. (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell*, **10**, 2573-2582.
- Op De Beeck, A., Montserret, R., Duvet, S., Cocquerel, L., Cacan, R., Barberot, B., Le Maire, M., Penin, F. and Dubuisson, J. (2000) The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J Biol Chem*, **275**, 31428-31437.
- Ou, W.J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature*, **364**, 771-776.
- Owens, R.J. and Rose, J.K. (1993) Cytoplasmic domain requirement for incorporation of a foreign envelope protein into vesicular stomatitis virus. *J Virol*, **67**, 360-365.
- Pak, C.C., Puri, A. and Blumenthal, R. (1997) Conformational changes and fusion activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein: [125I]iodonaphthyl azide photolabeling studies in biological membranes. *Biochemistry*, **36**, 8890-8896.

- Pal, R. and Wagner, R.R. (1987) Rhabdovirus membrane and maturation. In Wagner, R.R. (ed.) *Rhabdoviruses*. Plenum Press, pp. 75-128.
- Parker, B.A. and Stark, G.R. (1979) Regulation of simian virus 40 transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA. *J. Virol.*, **31**, 360-369.
- Parodi, A.J. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem*, **69**, 69-93.
- Pasteur, L. (1885) Méthode pour prévenir la rage après morsure. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, **101**, 765-774.
- Paterson, R.G. and Lamb, R.A. (1990) Conversion of a class II integral membrane protein into a soluble and efficiently secreted protein: multiple intracellular and extracellular oligomeric and conformational forms. *J Cell Biol*, **110**, 999-1011.
- Patil, C. and Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 349-355.
- Patricelli, M.P., Lashuel, H.A., Giang, D.K., Kelly, J.W. and Cravatt, B.F. (1998) Comparative characterization of a wild type and transmembrane domain- deleted fatty acid amide hydrolase: identification of the transmembrane domain as a site for oligomerization. *Biochemistry*, **37**, 15177-15187.
- Pattnaik, A.K. and Wertz, G.W. (1990) Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs. *J Virol*, **64**, 2948-2957.
- Pattnaik, A.K., Hwang, L., Li, T., Englund, N., Mathur, M., Das, T. and Banerjee, A.K. (1997) Phosphorylation within the amino-terminal acidic domain I of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is required for transcription but not for replication. *J Virol*, **71**, 8167-8175.
- Patton, J.T., Davis, N.L. and Wertz, G.W. (1984) N protein alone satisfies the requirement for protein synthesis during RNA replication of vesicular stomatitis virus. *J Virol*, **49**, 303-309.
- Peluso, R.W. and Moyer, S.A. (1988) Viral proteins required for the in vitro replication of vesicular stomatitis virus defective interfering particle genome RNA. *Virology*, **162**, 369-376.
- Peluso, R.W., Richardson, J.C., Talon, J. and Lock, M. (1996) Identification of a set of proteins (C' and C) encoded by the bicistronic P gene of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus and analysis of their effect on transcription by the viral RNA polymerase. *Virology*, **218**, 335-342.
- Poisson, N., Real, E., Gaudin, Y., Vaney, M.C., King, S., Jacob, Y., Tordo, N. and Blondel, D. (2001) Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J Gen Virol*, **82**, 2691-2696.

- Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J. and Lippincott-Schwartz, J. (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature*, **389**, 81-85.
- Préhaud, C., Coulon, P., LaFay, F., Thiers, C. and Flamand, A. (1988) Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J Virol*, **62**, 1-7.
- Puri, A., Winick, J., Lowy, R.J., Covell, D., Eidelman, O., Walter, A. and Blumenthal, R. (1988) Activation of vesicular stomatitis virus fusion with cells by pretreatment at low pH. *J Biol Chem*, **263**, 4749-4753.
- Qiao, H., Pelletier, S.L., Hoffman, L., Hacker, J., Armstrong, R.T. and White, J.M. (1998) Specific single or double proline substitutions in the "spring-loaded" coiled-coil region of the influenza hemagglutinin impair or abolish membrane fusion activity. *J Cell Biol*, **141**, 1335-1347.
- Qiao, H., Armstrong, R.T., Melikyan, G.B., Cohen, F.S. and White, J.M. (1999) A specific point mutant at position 1 of the influenza hemagglutinin fusion peptide displays a hemifusion phenotype. *Mol Biol Cell*, **10**, 2759-2769.
- Radford, S.E. (2000) Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci*, **25**, 611-618.
- Raha, T., Samal, E., Majumdar, A., Basak, S., Chattopadhyay, D. and Chattopadhyay, D.J. (2000) N-terminal region of P protein of Chandipura virus is responsible for phosphorylation-mediated homodimerization. *Protein Eng*, **13**, 437-444.
- Rand, R.P., Reese, T.S. and Miller, R.G. (1981) Phospholipid bilayer deformations associated with interbilayer contact and fusion. *Nature*, **293**, 237-238.
- Raux, H., Coulon, P., Lafay, F. and Flamand, A. (1995) Monoclonal antibodies which recognize the acidic configuration of the rabies glycoprotein at the surface of the virion can be neutralizing. *Virology*, **210**, 400-408.
- Raux, H., Flamand, A. and Blondel, D. (2000) Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *J Virol*, **74**, 10212-10216.
- Reagan, K.J. and Wunner, W.H. (1985) Rabies virus interaction with various cell lines is independent of the acetylcholine receptor. *Arch Virol*, **84**, 277-282.
- Reimer, U., el Mokdad, N., Schutkowski, M. and Fischer, G. (1997) Intramolecular assistance of cis/trans isomerization of the histidine- proline moiety. *Biochemistry*, **36**, 13802-13808.
- Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. and Fischer, G. (1998) Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *J Mol Biol*, **279**, 449-460.
- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C. and Harrison, S.C. (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, **375**, 291-298.

- Ridder, A.N., Morein, S., Stam, J.G., Kuhn, A., de Kruijff, B. and Killian, J.A. (2000) Analysis of the role of interfacial tryptophan residues in controlling the topology of membrane proteins. *Biochemistry*, **39**, 6521-6528.
- Rigaut, K.D., Birk, D.E. and Lenard, J. (1991) Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *J Virol*, **65**, 2622-2628.
- Riley, M.L., Wallace, B.A., Flitsch, S.L. and Booth, P.J. (1997) Slow alpha helix formation during folding of a membrane protein. *Biochemistry*, **36**, 192-196.
- Rimsky, L.T., Shugars, D.C. and Matthews, T.J. (1998) Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41- derived inhibitory peptides. *J Virol*, **72**, 986-993.
- Robison, C.S. and Whitt, M.A. (2000) The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *J Virol*, **74**, 2239-2246.
- Rolls, M.M., Webster, P., Balba, N.H. and Rose, J.K. (1994) Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell*, **79**, 497-506.
- Rose, J.K., Buonocore, L. and Whitt, M.A. (1991) A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques*, **10**, 520-525.
- Roth, M.G., Doyle, C., Sambrook, J. and Gething, M.J. (1986) Heterologous transmembrane and cytoplasmic domains direct functional chimeric influenza virus hemagglutinins into the endocytic pathway. *J Cell Biol*, **102**, 1271-1283.
- Ruigrok, R.W., Martin, S.R., Wharton, S.A., Skehel, J.J., Bayley, P.M. and Wiley, D.C. (1986) Conformational changes in the hemagglutinin of influenza virus which accompany heat-induced fusion of virus with liposomes. *Virology*, **155**, 484-497.
- Sagara, J., Tsukita, S., Yonemura, S. and Kawai, A. (1995) Cellular actin-binding ezrin-radixin-moesin (ERM) family proteins are incorporated into the rabies virion and closely associated with viral envelope proteins in the cell. *Virology*, **206**, 485-494.
- Sagara, J., Tochikura, T.S., Yamamoto, T., Tsukita, S. and Kawai, A. (1997) Immunological studies of a 21 kDa cellular component efficiently incorporated into rabies virion grown in a BHK-21 cell culture. *Microbiol Immunol*, **41**, 947-955.
- Saito, Y., Ihara, Y., Leach, M.R., Cohen-Doyle, M.F. and Williams, D.B. (1999) Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *Embo J*, **18**, 6718-6729.
- Salzwedel, K., West, J.T. and Hunter, E. (1999) A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J Virol*, **73**, 2469-2480.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.
- Sarver, R.W., Jr. and Krueger, W.C. (1991) An infrared and circular dichroism combined approach to the analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem*, **199**, 61-67.
- Schiene, C. and Fischer, G. (2000) Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 40-45.
- Schloemer, R.H. and Wagner, R.R. (1975) Cellular adsorption function of the sialoglycoprotein of vesicular stomatitis virus and its neuraminic acid. *J Virol*, **15**, 882-893.
- Schnell, M.J., Buonocore, L., Kretzschmar, E., Johnson, E. and Rose, J.K. (1996) Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11359-11365.
- Schnitzlein, W.M. and Reichmann, M.E. (1985) Characterization of New Jersey vesicular stomatitis virus isolates from horses and black flies during the 1982 outbreak in Colorado. *Virology*, **142**, 426-431.
- Schoch, C., Blumenthal, R. and Clague, M.J. (1992) A long-lived state for influenza virus-erythrocyte complexes committed to fusion at neutral pH. *FEBS Lett*, **311**, 221-225.
- Schoehn, G., Iseni, F., Mavrakis, M., Blondel, D. and Ruigrok, R.W. (2001) Structure of recombinant rabies virus nucleoprotein-RNA complex and identification of the phosphoprotein binding site. *J Virol*, **75**, 490-498.
- Scianimanico, S., Schoehn, G., Timmins, J., Ruigrok, R.H., Klenk, H.D. and Weissenhorn, W. (2000) Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein. *Embo J*, **19**, 6732-6741.
- Seif, I., Coulon, P., Rollin, P.E. and Flamand, A. (1985) Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J Virol*, **53**, 926-934.
- Shakhnovich, E.I. (1999) Folding by association. *Nat Struct Biol*, **6**, 99-102.
- Shakin-Eshleman, S.H., Remaley, A.T., Eshleman, J.R., Wunner, W.H. and Spitalnik, S.L. (1992) N-linked glycosylation of rabies virus glycoprotein. Individual sequons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell surface expression. *J Biol Chem*, **267**, 10690-10698.
- Shokralla, S., He, Y., Wanas, E. and Ghosh, H.P. (1998) Mutations in a carboxy-terminal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein G that affect membrane fusion activity. *Virology*, **242**, 39-50.
- Shokralla, S., Chernish, R. and Ghosh, H.P. (1999) Effects of double-site mutations of vesicular stomatitis virus glycoprotein G on membrane fusion activity. *Virology*, **256**, 119-129.

- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1998) Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell*, **95**, 871-874.
- Skorko-Glonek, J., Lipinska, B., Krzewski, K., Zolse, G., Bertoli, E. and Tanfani, F. (1997) HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem*, **272**, 8974-8982.
- Sleat, D.E., Chikkala, N.F., Gautam, S. and Banerjee, A.K. (1992) Restricted replication of vesicular stomatitis virus in T lymphocytes is coincident with a deficiency in a cellular protein kinase required for viral transcription. *J Gen Virol*, **73**, 3125-3132.
- Sodora, D.L., Cohen, G.H., Muggeridge, M.I. and Eisenberg, R.J. (1991) Absence of asparagine-linked oligosaccharides from glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 results in a structurally altered but biologically active protein. *J Virol*, **65**, 4424-4431.
- Sousa, M. and Parodi, A.J. (1995) The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Embo J*, **14**, 4196-4203.
- Stegmann, T., Hoekstra, D., Scherphof, G. and Wilschut, J. (1986) Fusion activity of influenza virus. A comparison between biological and artificial target membrane vesicles. *J Biol Chem*, **261**, 10966-10969.
- Steinhauer, D.A. and Holland, J.J. (1986) Direct method for quantitation of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA. *J Virol*, **57**, 219-228.
- Stillman, E.A. and Whitt, M.A. (1998) The length and sequence composition of vesicular stomatitis virus intergenic regions affect mRNA levels and the site of transcript initiation. *J Virol*, **72**, 5565-5572.
- Suh, K., Bergmann, J.E. and Gabel, C.A. (1989) Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins. *J Cell Biol*, **108**, 811-819.
- Suh, J.Y., Lee, Y.T., Park, C.B., Lee, K.H., Kim, S.C. and Choi, B.S. (1999) Structural and functional implications of a proline residue in the antimicrobial peptide gaegurin. *Eur J Biochem*, **266**, 665-674.
- Superti, F., Hauttecoeur, B., Morelec, M.J., Goldoni, P., Bizzini, B. and Tsiang, H. (1986) Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J Gen Virol*, **67**, 47-56.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A.T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, **395**, 347-353.
- Takacs, A.M., Perrine, K.G., Barik, S. and Banerjee, A.K. (1991) Alteration of specific amino acid residues in the acidic domain I of VSV phosphoprotein (P) converts a GAL4-P(I) hybrid into a transcriptional activator. *New Biol*, **3**, 581-591.

- Tatu, U. and Helenius, A. (1997) Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **136**, 555-565.
- Thomas, D., Newcomb, W.W., Brown, J.C., Wall, J.S., Hainfeld, J.F., Trus, B.L. and Steven, A.C. (1985) Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis. *J Virol*, **54**, 598-607.
- Thornton, G.B., Kopchick, J.J., Stacey, D.W. and Banerjee, A.K. (1983) Microinjection of vesicular stomatitis virus ribonucleoprotein into animal cells yields infectious virus. *Biochem Biophys Res Commun*, **116**, 1160-1167.
- Thoulouze, M.I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H. and Lafon, M. (1998) The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol*, **72**, 7181-7190.
- Tokunaga, F., Brostrom, C., Koide, T. and Arvan, P. (2000) Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded N-linked glycoproteins is suppressed upon inhibition of ER mannosidase I. *J Biol Chem*, **275**, 40757-40764.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A. and Keith, G. (1986a) Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Res*, **14**, 2671-2683.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G. and Rougeon, F. (1986b) Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3914-3918.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G. and Rougeon, F. (1988) Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology*, **165**, 565-576.
- Tordo, N., Bourhy, H., Sather, S. and Ollio, R. (1993) Structure and expression in baculovirus of the Mokola virus glycoprotein: an efficient recombinant vaccine. *Virology*, **194**, 59-69.
- Tse, F.W., Iwata, A. and Almers, W. (1993) Membrane flux through the pore formed by a fusogenic viral envelope protein during cell fusion. *J Cell Biol*, **121**, 543-552.
- Tsiang, H. (1988) Rabies virus infection of myotubes and neurons as elements of the neuromuscular junction. *Rev Infect Dis*, **10 Suppl 4**, S733-738.
- Tsurudome, M., Gluck, R., Graf, R., Falchetto, R., Schaller, U. and Brunner, J. (1992) Lipid interactions of the hemagglutinin HA2 NH2-terminal segment during influenza virus-induced membrane fusion. *J Biol Chem*, **267**, 20225-20232.
- Tuffereau, C., Leblois, H., Benejean, J., Coulon, P., Lafay, F. and Flamand, A. (1989) Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology*, **172**, 206-212.

- Tuffereau, C., Benejean, J., Blondel, D., Kieffer, B. and Flamand, A. (1998) Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *Embo J*, **17**, 7250-7259.
- Ubol, S. and Kasisith, J. (2000) Reactivation of Nedd-2, a developmentally down-regulated apoptotic gene, in apoptosis induced by a street strain of rabies virus. *J Med Microbiol*, **49**, 1043-1046.
- Ugolini, G. (1995) Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: transfer from hypoglossal motoneurons to connected second- order and higher order central nervous system cell groups. *J Comp Neurol*, **356**, 457-480.
- van Meer, G. and Simons, K. (1982) Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions. *Embo J*, **1**, 847-852.
- von Kobbe, C., van Deursen, J.M., Rodrigues, J.P., Sitterlin, D., Bachi, A., Wu, X., Wilm, M., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E. (2000) Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin nup98. *Mol Cell*, **6**, 1243-1252.
- Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.J., Doherty, J.J., 2nd, Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (1991) SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, **266**, 19599-19610.
- Wagner, R.R. and Rose, J.K. (1996) Rhabdiviridae. In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott - Raven, Philadelphia, pp. 1121-1135.
- Walker, P.J. and Kongsuwan, K. (1999) Deduced structural model for animal rhabdovirus glycoproteins. *J Gen Virol*, **80**, 1211-1220.
- Weber, T., Paesold, G., Galli, C., Mischler, R., Semenza, G. and Brunner, J. (1994) Evidence for H(+)-induced insertion of influenza hemagglutinin HA2 N- terminal segment into viral membrane. *J Biol Chem*, **269**, 18353-18358.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, **387**, 426-430.
- Weissenhorn, W., Carfi, A., Lee, K.H., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1998) Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell*, **2**, 605-616.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L.J., Harrison, S.C., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1999) Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol*, **16**, 3-9.
- Wertz, G.W., Perepelitsa, V.P. and Ball, L.A. (1998) Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3501-3506.
- Wharton, S.A., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1986) Studies of influenza haemagglutinin-mediated membrane fusion. *Virology*, **149**, 27-35.

- Whelan, S.P. and Wertz, G.W. (1999) Regulation of RNA synthesis by the genomic termini of vesicular stomatitis virus: identification of distinct sequences essential for transcription but not replication. *J Virol*, **73**, 297-306.
- White, J., Matlin, K. and Helenius, A. (1981) Cell fusion by Semliki Forest, influenza, and vesicular stomatitis viruses. *J Cell Biol*, **89**, 674-679.
- Whitt, M.A., Chong, L. and Rose, J.K. (1989) Glycoprotein cytoplasmic domain sequences required for rescue of a vesicular stomatitis virus glycoprotein mutant. *J Virol*, **63**, 3569-3578.
- Whitton, J.L. and Oldstone, M.B.A. (1996) Immune response to viruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott - Raven, Philadelphia, pp. 345-374.
- Wilson, I.A., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1981) Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, **289**, 366-373.
- Winkler, W.G. (1968) Airborne rabies virus isolation. *Wildl Dis*, **4**, 37-40.
- Winkler, W.G., Fashinell, T.R., Leffingwell, L., Howard, P. and Conomy, P. (1973) Airborne rabies transmission in a laboratory worker. *Jama*, **226**, 1219-1221.
- Wojczyk, B.S., Stwora-Wojczyk, M., Shakin-Eshleman, S., Wunner, W.H. and Spitalnik, S.L. (1998) The role of site-specific N-glycosylation in secretion of soluble forms of rabies virus glycoprotein. *Glycobiology*, **8**, 121-130.
- Wolynes, P.G., Onuchic, J.N. and Thirumalai, D. (1995) Navigating the folding routes. *Science*, **267**, 1619-1620.
- Wormald, M.R. and Dwek, R.A. (1999) Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure Fold Des*, **7**, R155-160.
- Wunner, W.H., Dietzschold, B., Smith, C.L., Lafon, M. and Golub, E. (1985) Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. *Virology*, **140**, 1-12.
- Wunner, W.H. (1987) Rabies viruses - Pathogenesis and immunity. In Wagner, R.R. (ed.) *The Rhabdoviruses*. Plenum Press, New-York, pp. 361-426.
- Yamada, S. and Ohnishi, S. (1986) Vesicular stomatitis virus binds and fuses with phospholipid domain in target cell membranes. *Biochemistry*, **25**, 3703-3708.
- Yang, J., Hooper, D.C., Wunner, W.H., Koprowski, H., Dietzschold, B. and Fu, Z.F. (1998) The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. *Virology*, **242**, 107-117.
- Yang, J., Koprowski, H., Dietzschold, B. and Fu, Z.F. (1999) Phosphorylation of rabies virus nucleoprotein regulates viral RNA transcription and replication by modulating leader RNA encapsidation. *J Virol*, **73**, 1661-1664.

- Yang, X., Florin, L., Farzan, M., Kolchinsky, P., Kwong, P.D., Sodroski, J. and Wyatt, R. (2000) Modifications that stabilize human immunodeficiency virus envelope glycoprotein trimers in solution. *J Virol*, **74**, 4746-4754.
- Yano, H. and Chao, M.V. (2000) Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv*, **74**, 253-260.
- Zagouras, P., Ruusala, A. and Rose, J.K. (1991) Dissociation and reassociation of oligomeric viral glycoprotein subunits in the endoplasmic reticulum. *J Virol*, **65**, 1976-1984.
- Zakowski, J.J., Petri, W.A., Jr. and Wagner, R.R. (1981) Role of matrix protein in assembling the membrane of vesicular stomatitis virus: reconstitution of matrix protein with negatively charged phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **20**, 3902-3907.
- Zapun, A., Darby, N.J., Tessier, D.C., Michalak, M., Bergeron, J.J. and Thomas, D.Y. (1998) Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem*, **273**, 6009-6012.
- Zapun, A., Jakob, C.A., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (1999) Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure Fold Des*, **7**, R173-182.
- Zhu, Q. and Courtney, R.J. (1988) Chemical crosslinking of glycoproteins on the envelope of herpes simplex virus. *Virology*, **167**, 377-384.

Annexe

Article paru dans le cahier n°3 (avril 2001) des Ecoles Physique et Chimie du Vivant -
Membranes biologiques (pp. 71-78)

Les changements de conformation des glycoprotéines virales fusogènes.

Les changements de conformation des glycoprotéines virales fusogènes

Antoine MAILLARD et Yves GAUDIN

CNRS - UPR 9053, Laboratoire de Génétique des Virus,
avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex.

Les virus enveloppés libèrent leur génome dans le cytoplasme de la cellule hôte par un mécanisme de fusion membranaire. Ce processus, qui a lieu après l'interaction entre le virus et ses récepteurs, implique une ou plusieurs glycoprotéines virales transmembranaires. Les virus enveloppés peuvent être classés en deux catégories selon que la fusion se produit au niveau de la membrane plasmique de la cellule ou après endocytose au niveau de la membrane de l'endosome. Dans tous les cas étudiés à ce jour, l'ectodomaine de la glycoprotéine virale fusogène subit un changement de conformation important qui lui permet d'exposer à sa surface un domaine hydrophobe qui va interagir avec les membranes cellulaires et/ou virales et les déstabiliser. Pour les virus qui fusionnent avec la membrane plasmique (cas des paramyxovirus, des rétrovirus et des herpesvirus), le changement de conformation est déclenché par la reconnaissance d'un ou plusieurs récepteurs présents à la surface de la cellule cible. Pour les virus qui fusionnent avec la membrane de l'endosome, le réarrangement structural est déclenché par l'acidification progressive de ce compartiment. Il faut aussi noter que lorsque ce changement de conformation est déclenché en absence de membrane cible, il conduit à l'inactivation des propriétés de fusion de la glycoprotéine fusogène.

En dépit de nombreux travaux menés principalement sur le virus de la grippe, les mécanismes moléculaires à l'origine de la fusion membranaire sont encore mal connus et, par conséquent, largement débattus. Toutefois, des expériences menées sur des systèmes modèles et sur la fusion virale (Chernomordik *et al.*, 1998; Gaudin, 2000) suggèrent que les structures adoptées par les lipides au cours du processus de fusion sont très semblables d'un système à l'autre. En effet, dans tous les systèmes étudiés à ce jour, on a pu mettre en évidence des effets identiques (en terme d'inhibition ou d'activation de la fusion) lors de l'incorporation de lipides de forme conique (comme l'acide oléique) et de forme conique inversée (comme les lysophosphatidylcholines) dans l'une ou l'autre des monocouches de la membrane. Ces lipides sont en effet connus pour imposer une courbure à la monocouche dans laquelle ils sont incorporés. Ainsi, les lysophosphatidylcholines favorisent des courbures positives de type micellaire, alors que l'acide oléique favorise les courbures négatives rencontrées dans les phases hexagonales de type II. Analysé dans ce contexte, l'effet des différents lipides sur la fusion a permis de proposer un modèle universel (Fig. 1). Ce modèle suggère que le premier intermédiaire est un

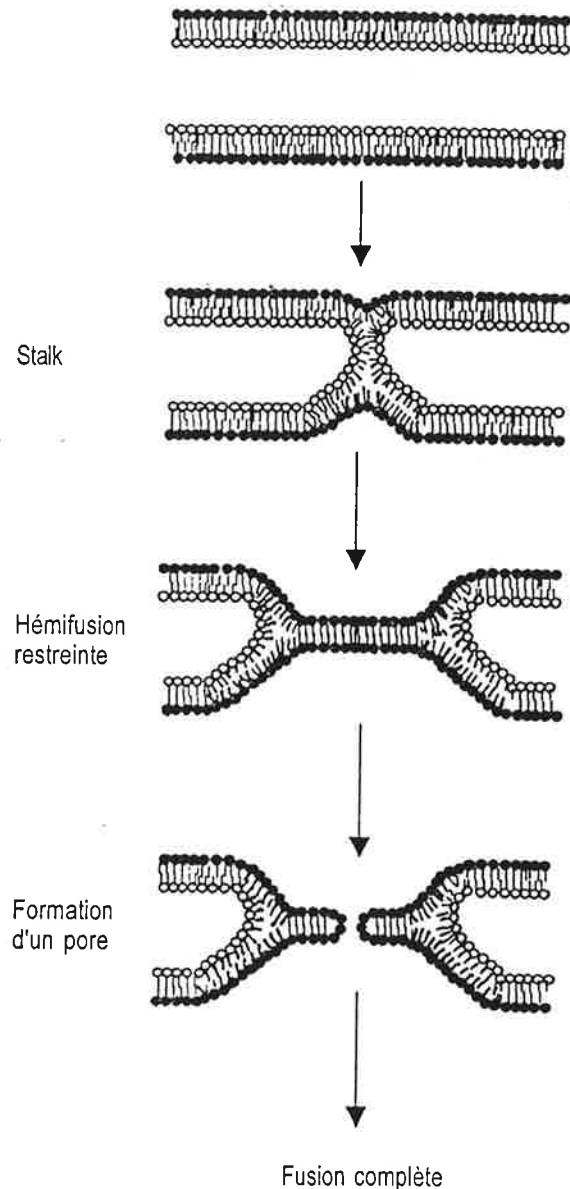


Figure 1 : Modèle universel proposé pour la fusion membranaire (Chernomordik *et al.*, 1998; Gaudin, 2000).

"stalk" (terme que l'on pourrait traduire par tige, pédoncule ou... trognon), structure formée par la connexion initiale entre les deux monocouches externes des membranes en train de fusionner. La formation de ce stalk est inhibée par la présence de lysophosphatidylcholine dans la couche externe des membranes. Le

stalk s'élargirait permettant aux monocouches internes de venir au contact l'une de l'autre et de former ce qu'on appelle un diaphragme d'hémifusion. Suivant les systèmes expérimentaux, l'hémifusion peut être restreinte ou non restreinte selon qu'il y a échange de lipides entre les deux membranes. L'hémifusion non restreinte a été observée lors de la fusion induite par une hémagglutinine (HA) du virus de la grippe modifiée, ancrée dans la membrane non plus par son domaine transmembranaire mais par un glycophosphatidylinositol (GPI-HA; Kemble *et al.*, 1994). L'hémifusion restreinte est mise en évidence lorsqu'on bloque, de façon réversible, le processus de fusion induit par HA à 4°C (Chernomordik *et al.*, 1998). Enfin, la formation d'un pore puis son élargissement au sein du diaphragme d'hémifusion conduiraient ensuite à la fusion complète des deux membranes (Chernomordik *et al.*, 1998). Cette dernière étape semble être extrêmement coûteuse en énergie et, tant que le pore n'a pas atteint une taille limite, l'organisation des lipides au sein de la structure fusogénique peut revenir au stade initial où les deux membranes sont séparées (Gaudin, 2000; Leikina & Chernomordik, 2000). Le rôle des protéines fusogènes apparaît donc multiple. Elles doivent successivement induire la déformation initiale des bicouches, déstabiliser cette structure pour y former un pore, et enfin, élargir ce dernier pour achever le processus de fusion.

1. L'HEMAGGLUTININE (HA) DU VIRUS GRIPPAL : LE MODELE DES GLYCOPROTEINES FUSOGENES

1.1. Structure de HA dans sa conformation native

L'hémagglutinine du virus de la grippe est la glycoprotéine fusogène la mieux caractérisée à ce jour tant au niveau structural que fonctionnel. Son activité de fusion est déclenchée dans l'environnement acide de l'endosome et est détectée en dessous d'un pH seuil compris entre 5 et 6 (variable selon les souches virales). HA est une glycoprotéine de type I qui est synthétisée sous la forme d'un précurseur HA0 clivé par une protéase intracellulaire (très probablement la furine) dans l'appareil de Golgi pour donner naissance à deux polypeptides HA1 et HA2. HA1 contient le domaine de reconnaissance de l'acide sialique qui est le récepteur du virus. HA2, qui est ancrée dans la membrane virale par un peptide hydrophobe transmembranaire, porte l'activité de fusion. HA est un homotrimère, chaque protomère est constitué d'une chaîne HA1 et d'une chaîne HA2 liées covalamment par un pont disulfure.

A la surface du virus, l'ectodomaine de HA peut être clivé par la bromélaïne au niveau du résidu 175 de HA2. On obtient alors un fragment soluble appelé BHA. C'est cette forme soluble, qui a été cristallisée, dont la structure a été déterminée à la résolution atomique (Wilson *et al.*, 1981; Fig. 2). Au sein du trimère, la plus grande partie de HA2 forme un faisceau trimérique d'hélices torsadées (coiled-coil). HA1 est positionnée au sommet de cette structure et contient les sites antigéniques de la molécule ainsi que la poche capable de lier l'acide sialique.

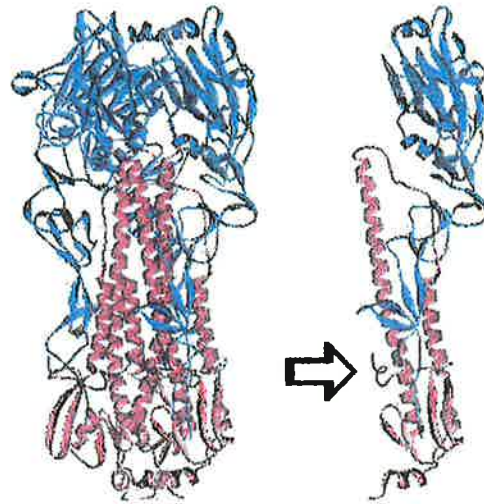


Figure 2 : Structure de BHA (Wilson *et al.*, 1981).

Un trimère (à gauche) et un monomère (à droite) sont représentés. HA1 est colorée en cyan. HA2 est colorée en rose. L'extrémité aminoterminal de HA2, ou peptide de fusion, est indiquée par la flèche. Cette figure et les suivantes ont été préparées à l'aide de WebLab Viewer (Molecular Simulations).

1.2. Structure de HA après la transition structurale induite à bas pH

A bas pH (entre 5 et 6 selon les souches virales), HA subit un changement de conformation irréversible. Au cours de cette transition structurale, le peptide hydrophobe aminoterminal de HA2, que l'on appelle le peptide de fusion et qui est enfoui au cœur de la molécule dans la structure native (Fig. 2), est exposé et devient capable d'interagir avec les membranes et de les déstabiliser (Tsurudome *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994).

Les études effectuées sur la structure de HA à bas pH ont révélé une des plus importantes transitions structurales rencontrée chez une protéine. Ainsi, on estime que l'amplitude du mouvement qu'effectue le peptide de fusion au cours de cette transition est de 100 Å. A l'issue de ce changement de conformation, l'interface entre deux protomères HA1 au sein de la tête globulaire trimérique est détruite. Il en est de même de l'interface entre HA1 et HA2 au sein d'un même monomère. La structure tertiaire de HA1 ne semble pas affectée de façon significative (Bizebard *et al.*, 1995). En revanche, la conformation de HA2 est complètement modifiée.

Après cette transition structurale, la cristallisation de BHA dans son intégrité est impossible : les molécules se sont agrégées *via* leur peptide hydrophobe pour former des rosettes. Toutefois, la plus grande partie de HA1 peut alors être clivée par une protéolyse ménagée par la trypsine. Après ce traitement, la protéine résultante composée de BHA2 et des 27 acides aminés aminotermiaux de HA1 est encore agrégée sous forme de rosettes, mais elle peut être remise en solution par un traitement à la thermolysine qui clive (au niveau du résidu 38 de HA2) le peptide de fusion et un petit feuillet β composé de deux brins antiparallèles. Le produit de ces traitements suc-

cessifs appelé TBHA2 est soluble et a été cristallisé (Bullough *et al.*, 1994; Fig. 3). TBHA2 est toujours trimérique et le domaine d'oligomérisation est constitué d'un faisceau de trois hélices torsadées. Lorsqu'on compare la structure de TBHA2 avec celle de BHA2, on constate que la grande hélice de BHA2 (résidus 76 à 129 en bleu, cyan et rouge sur la figure 3) se brise à l'endroit où était inséré le peptide de fusion. L'hélice colorée en cyan adopte alors une structure en boucle et l'hélice colorée en rouge vient se replier de façon antiparallèle contre l'hélice colorée en bleu. A son extrémité aminoterminal, l'hélice colorée en bleu s'allonge en recrutant les acides aminés 57 à 75 initialement structurés en une grande boucle (de couleur cyan) ainsi que l'hélice aminoterminal de BHA2 pour former une grande hélice s'étendant des acides ami-

nés 40 à 104. Le peptide de fusion est donc situé à l'extrémité de cette longue hélice. L'extrémité carboxyterminale de TBHA2 étant désordonnée dans le cristal, il était impossible de déterminer la position du domaine transmembranaire de HA par rapport à la structure obtenue. Cependant, récemment, un fragment s'étendant des acides aminés 23 à 185 de HA a été exprimé en bactérie puis cristallisé (Chen *et al.*, 1999). Les résidus 153 à 178 forment une structure étendue de 72 Å, positionnée de façon antiparallèle à la grande hélice, dont la conformation rappelle approximativement celle des polyprolines de type II. Ceci a indiqué sans ambiguïté que le peptide de fusion et le domaine transmembranaire étaient localisés à la même extrémité de la structure.

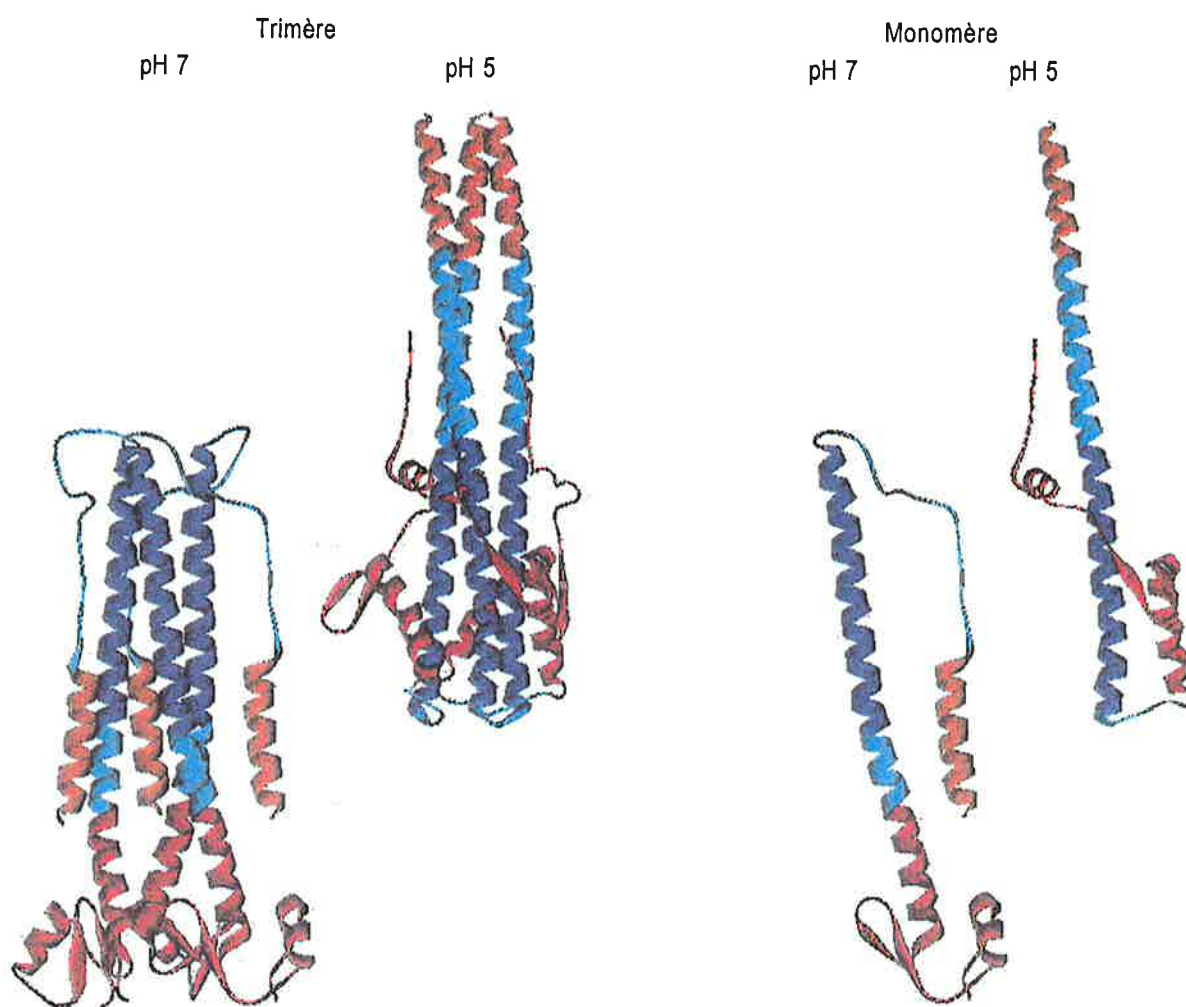


Figure 3 : Structure du fragment correspondant aux résidus 40 à 162 de HA2 tel que dans BHA (pH 7) (Wilson *et al.*, 1981) et dans TBHA2 (pH 5) (Bullough *et al.*, 1994). Les résidus dont la structure secondaire change (transition boucle-hélice ou réciproquement), 57-75 et 105-112, sont en cyan.

1.3. Rôle de la transition structurale dans le processus de fusion

En absence de membrane cible, le changement de conformation de HA déclenché à bas pH induit l'inactivation des propriétés de fusion de la molécule. De ce fait, la structure de TBHA2 déterminée par ra-

diocristallographie correspond très certainement à la forme inactive. Certains groupes ont donc proposé que la forme de HA active au cours du phénomène de fusion serait en fait peu différente de la structure native de HA (Stegmann *et al.*, 1990). Cette hypothèse était renforcée par le fait que, pour certaines souches

virales, dans des conditions de pH et de température où la fusion était détectée, aucune modification drastique de la structure de HA n'était observée en microscopie électronique ou à l'aide d'anticorps monoclonaux. Cependant, dans ces dernières expériences, il était difficile d'exclure que les quelques hémagglutinines directement impliquées dans le processus de fusion n'avaient pas déjà changé de conformation.

A l'heure actuelle, il est quasiment admis que le changement de conformation de HA2 est absolument requis pour que la fusion ait lieu. Ce point de vue est largement étayé par les résultats suivants :

1/ Dans la plupart des cas, la transition structurale de HA et la fusion surviennent dans les mêmes conditions de pH et de température (Ruigrok *et al.*, 1986).

2/ En absence de membrane cible, le changement de conformation de HA conduit à l'insertion du peptide de fusion dans la membrane virale (Weber *et al.*, 1994). C'est-à-dire qu'après la transition structurale, comme le suggère la structure déterminée par Chen *et al.* (1999), le domaine transmembranaire ainsi que le peptide de fusion sont dans la même membrane, ce qui est bien ce qu'on attend à la fin du processus de fusion.

3/ L'introduction de prolines dans la boucle de HA qui défavorisent la formation du coiled-coil supprime l'activité de fusion de HA (Qiao *et al.*, 1998).

4/ L'analyse des séquences en acides aminés de nombreuses autres protéines impliquées dans la fusion virale ou cellulaire (les protéines SNARE¹) a révélé des répétitions d'heptades du type *abcdefg*, avec *a* et *d* résidus hydrophobes (avec une préférence pour les leucines ou isoleucines), caractéristiques des structures en coiled-coil. La présence de ces faisceaux d'hélices torsadées a d'ailleurs été vérifiée dans un certain nombre de cas détaillés dans le paragraphe suivant.

2. LES AUTRES GLYCOPROTEINES VIRALES FUSOGENES

2.1. Le cas des glycoprotéines fusogènes activées par un clivage protéolytique

L'étude structurale de fragments de la glycoprotéine fusogène des rétrovirus (VIH, HTLV, MLV), d'un paramyxovirus et du virus Ebola ont indiqué que ces protéines avaient une structure très semblable à celle de TBHA2. Un point commun à toutes ces molécules est que, comme HA, elles sont synthétisées sous forme d'un précurseur qui doit être clivé pour générer un peptide de fusion aminoterminal. Ce clivage induit la formation de gp120 et gp41 chez le VIH, SU et TM chez HTLV et MLV, F1 et F2 chez les paramyxovirus et enfin GP1 et GP2 chez le virus Ebola. Gp41, TM, F1 et GP2 constituent la partie transmembranaire de la glycoprotéine et sont donc équivalents à HA2. Leur ectodomaine forme un faisceau d'hélices torsadées qui donne à la protéine une structure glo-

bale en forme de bâtonnet. Ces molécules, pour pouvoir être cristallisées, se devaient d'être solubles et elles ne possèdent bien entendu plus, ni le le domaine transmembranaire ni le peptide de fusion. Cependant, leur structure (Fig. 4) indique que ces deux domaines sont situés à la même extrémité du bâtonnet (comme chez TBHA2).

Il faut aussi noter que, à la différence de HA, la structure de ces glycoprotéines sous la forme complète (c'est-à-dire des complexes gp120/gp41, SU/TM, F1/F2 et GP1/GP2) et native est inconnue. Les fragments cristallisés ont été exprimés en bactéries ou synthétisés chimiquement. Ils se replient alors spontanément dans cette conformation en coiled-coil (Fig. 4) qui est extrêmement résistante à la dénaturation par la chaleur. La structure déterminée de gp41, TM, F1 et GP2 est donc probablement la plus stable pour ce domaine de la glycoprotéine fusogène. Cependant, cette conformation n'est très probablement pas celle adoptée dans la molécule native complète. Elle correspond sans doute à la structure de ces fragments après la transition structurale, à la fin du processus de fusion. Pour ces protéines comme pour l'hémagglutinine de grippe, le clivage protéolytique post-traductionnel a donc pour effet de rendre la structure native métastable et, ce faisant, d'autoriser le changement de conformation qui sera déclenché à bas pH ou lors de l'interaction avec un récepteur spécifique.

Récemment, la structure d'un complexe minimal de fusion membranaire cellulaire (complexe des v-SNARE et t-SNARE) assemblé à partir de peptides recombinants a révélé la grande similitude entre cette structure et celle de TBHA2 (Fig. 4). Les glycoprotéines virales activées par clivage ainsi que les protéines impliquées dans la fusion cellulaire semblent donc définir une même catégorie de protéines fusogènes. Il convient ici de noter que dans cette catégorie, on rencontre aussi bien des glycoprotéines virales dont les propriétés de fusion sont exprimées à bas pH (cas de la grippe) qu'après interaction avec un récepteur spécifique (cas du VIH).

2.2. Le cas des glycoprotéines fusogènes qui ne sont pas clivées

Il existe d'autres glycoprotéines virales fusogènes qui ne subissent pas directement de clivage protéolytique activateur et qui, malgré tout, sont synthétisées sous une forme métastable. Pour ces protéines, le peptide de fusion est interne (c'est-à-dire qu'il n'est pas localisé à l'extrémité aminoterminal de la protéine); le changement de conformation irréversible est déclenché à bas pH et se traduit par un réarrangement de la structure quaternaire de la protéine. Les glycoprotéines virales les mieux caractérisées appartenant à cette catégorie sont les glycoprotéines E1 du virus de la forêt de Semliki (SFV, un alphavirus) et E du virus de l'encéphalite porté par les tiques (TBEV, un flavivirus).

Dans le cas du SFV, la glycoprotéine est synthétisée sous la forme d'un précurseur p62E1, p62 est ensuite clivée en E2 et E3. Les spicules virales natives, à la surface des virions, sont donc constituées de trimères (E1/E2/E3)₃. Après exposition à bas pH,

¹ SNARE : soluble N-ethyl-maleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptors, protéines membranaires impliquées dans le trafic vésiculaire, les v-SNARE à la surface des vésicules, les t-SNARE (target) sur les compartiments cibles. (note de l'éditeur)

E2 et E1 se dissocient et E1 forme un nouveau trimère (E1)₃ (Gibbons *et al.*, 2000). Pour le virus de l'encéphalite porté par les tiques, la protéine fusogène E est transportée en association avec la protéine prM qui est ensuite clivée pour former M. E forme alors un dimère à la surface des virions qui a pu être clivé par la trypsine pour produire un ectodomaine soluble qui a

été cristallisé et dont la structure a été résolue (Rey *et al.*, 1995). Cette structure est complètement différente de celle de BHA (Fig. 5). Lorsque les virions sont incubés à bas pH, le dimère se dissocie en monomères qui se réassocient de façon irréversible pour former de nouveaux trimères (Allison *et al.*, 1995).

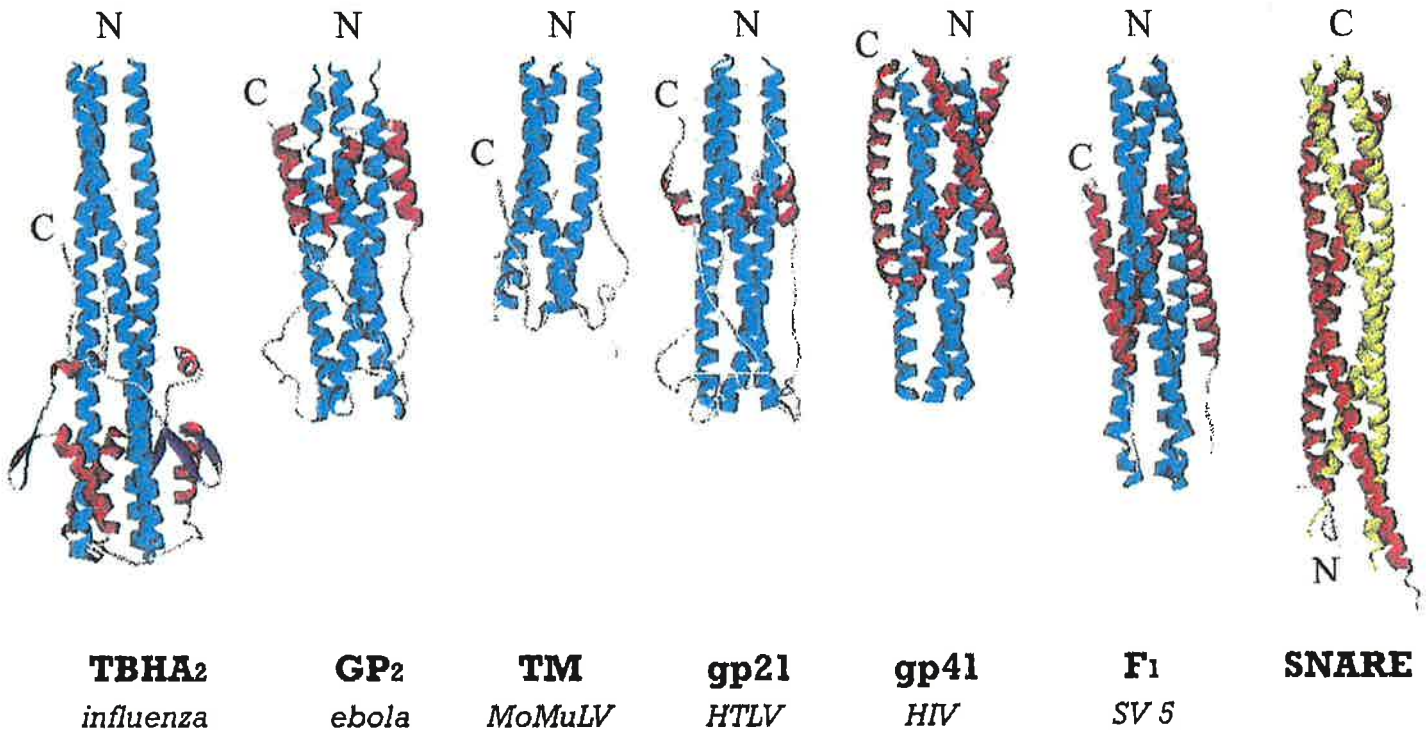


Figure 4 : Comparaison des structures de différentes protéines de fusion virales et cellulaires.

Les extrémités amino- et carboxyterminales des fragments sont signalées par N et C, respectivement. Dans le cas des protéines virales, les hélices du coiled-coil sont colorées en cyan. L'extrémité aminoterminal est précédée par le peptide de fusion, tandis que la partie carboxyterminale se poursuit par le domaine transmembranaire. Ces deux domaines sont absents dans les entités cristallisées. Dans le cas du SNARE, les deux hélices colorées en jaune appartiennent aux deux protéines transmembranaires (syntaxine et synaptobrevine) qui participent au complexe : l'une est ancrée dans la membrane de la vésicule et l'autre dans la membrane de l'organite cible. En rouge, les deux hélices de SNAP25B.

[Structures publiées dans Bullough *et al.* (1994); Weissenhorn *et al.* (1998); Fass *et al.* (1996); Kobe *et al.* (1999); Weissenhorn *et al.* (1997); Baker *et al.* (1999); Sutton *et al.* (1998)].

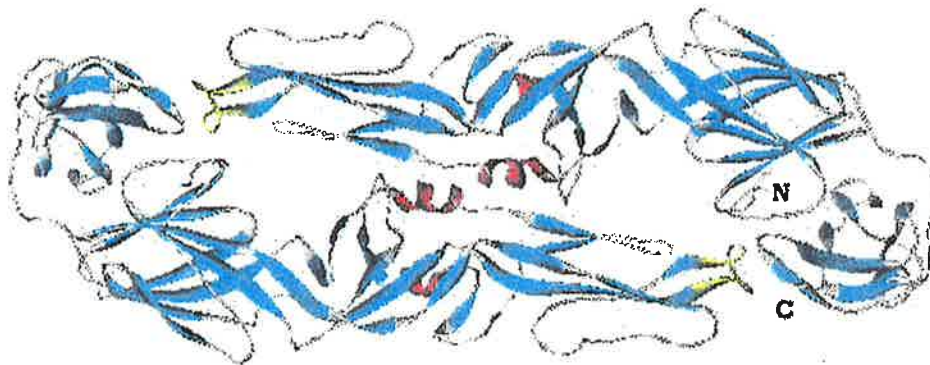


Figure 5 : Structure de l'ectodomaine de la protéine E du TBEV à pH neutre (Rey *et al.*, 1995).

La face présentée correspond à une vue de dessus. Les feuillets sont en cyan et les hélices en rouge. Les résidus 98 à 113 qui pourraient constituer le peptide de fusion interne sont colorés en jaune. Les extrémités amino- et carboxyterminales de l'un de deux monomères sont signalées par N et C, respectivement.

Dans ces deux cas, c'est le clivage des protéines p62 et prM qui rend les protéines E et E1 métastables et autorise leur changement de conformation qui sera déclenché à bas pH. Il faut aussi noter que les séquences en acides aminés de E et de E1 ne contiennent pas les répétitions en heptades caractéristiques des faisceaux d'hélices torsadées. Il est donc probable que ces deux glycoprotéines définissent une autre classe de protéines fusogènes.

2.3. L'exception des rhabdovirus

On pense que l'énergie nécessaire à la fusion des membranes est apportée par la transition structurale des glycoprotéines fusogènes virales depuis leur forme métastable jusque leur forme finale stable inactive (Ruigrok *et al.*, 1986; Carr *et al.*, 1997). Il convient toutefois de noter qu'il existe au moins une exception à la règle selon laquelle les glycoprotéines virales sont synthétisées sous une forme métastable : la glycoprotéine G des rhabdovirus (famille virale à laquelle appartient les virus de la rage et de la stomatite vésiculeuse, VSV). G est une glycoprotéine de type I. Elle n'est pas soumise à un clivage protéolytique activateur et son peptide de fusion est interne. Comme les autres glycoprotéines virales dont les propriétés de fusion sont exprimées en milieu acide, elle subit un changement de conformation à bas pH (pour revue, cf. Gaudin *et al.*, 1999). En absence de membrane cible, cette transition structurale conduit aussi à l'inactivation des propriétés de fusion du virus mais, à la différence de ce qui a été observé pour les autres familles virales, elle est réversible : les virions préalablement incubés à bas pH recouvrent l'intégralité de leur activité fusogénique lorsque le pH du milieu est remonté au-delà de 7. En fait, pour les rhabdovirus, il existe un équilibre entre la structure native et la structure inactive de G. La proportion des glycoprotéines présentes dans l'une ou l'autre des conformations varie en fonction du pH, la structure inactive étant la plus stable à bas pH. L'existence d'un équilibre implique que l'énergie libérée lors de la transition structurale vers la forme inactive est bien inférieure à celle libérée dans les autres systèmes viraux. Pour les rhabdovirus, la question se pose donc de savoir d'où vient l'énergie nécessaire au processus de fusion.

3. REMARQUES FINALES ET PERSPECTIVES

Force est de constater que la connaissance des structures de nombreuses protéines virales fusogènes n'a toujours pas permis de comprendre le mécanisme de la fusion membranaire à l'échelle moléculaire. La principale explication est que, pour des raisons évidentes, seules les structures des états stables et solubles ont été déterminées. Ces structures incomplètes (puisque privées de leur domaine transmembranaire et du peptide de fusion lorsque celui-ci est exposé) ne donnent accès qu'aux conformations initiales (c'est-à-dire avant que la fusion ait commencé) et finales (quand le processus de fusion est achevé) de la glycoprotéine fusogène alors que le phénomène de fusion se décompose en plusieurs étapes (Stegmann *et al.*, 1990; Chernomordik *et al.*, 1998; Leikina &

Chernomordik, 2000; Gaudin, 2000). Ceci implique l'existence d'états structuraux transitoires très probablement stabilisés par la présence des membranes cibles et virales et qui sont donc non cristallisables. Même à l'aide de techniques spectroscopiques, l'étude de ces conformations intermédiaires n'est pas aisée : les glycoprotéines dans ces états ne sont probablement présentes qu'au niveau des sites de fusion et ne constituent donc qu'une faible proportion de l'ensemble des glycoprotéines des virions.

Toutes ces études cristallographiques ne donnent pas non plus d'informations sur le mécanisme de déstabilisation des membranes cibles et virales par le peptide fusion et/ou le domaine transmembranaire de la glycoprotéine fusogène. Des expériences de spectroscopie infrarouge ont toutefois montré que les peptides de fusion aminoterminaux adoptaient une structure en hélice oblique lorsqu'ils s'inséraient dans la membrane (Durell *et al.*, 1997). Des mutations affectant cette capacité affectent aussi les propriétés de fusion de la glycoprotéine. Il a également été démontré que la présence du domaine transmembranaire était nécessaire pour la déstabilisation du diaphragme d'hémifusion (Kemble *et al.*, 1994). En particulier, un rôle des glycines de ce domaine a été mis en évidence chez le VSV (Cleverley & Lenard, 1998) et le virus de la grippe (Melikyan *et al.*, 1999). Il est aussi possible qu'au cours du processus de fusion, il y ait interaction entre le domaine transmembranaire et le peptide de fusion. Une telle interaction, compatible avec la structure de Chen *et al.* (1999), est suggérée par le fait que la mutation de la glycine aminotermine de HA2 en sérine confère aussi à la glycoprotéine un phénotype d'hémifusion (Qiao *et al.*, 1999) qui indique que le peptide de fusion est lui aussi impliqué dans la formation du pore et son élargissement.

Enfin, de nombreuses études (par exemple : Blumenthal *et al.*, 1996) indiquent que plusieurs glycoprotéines fusogènes sont impliquées au niveau d'un site de fusion. Le regroupement de ces glycoprotéines en un anneau autour du stalk, puis du diaphragme d'hémifusion, pourrait expliquer la restriction à la diffusion des lipides observée pour le virus de la grippe (Chernomordik *et al.*, 1998) et celui de la rage (Gaudin, 2000). Chez des mutants du virus de la rage, il a été observé dans certaines conditions, dites de préfusion, la formation d'un réseau hexagonal de glycoprotéines à la surface du virus. Il a été proposé qu'un de ces hexagones pourrait constituer la structure minimale de fusion (Gaudin *et al.*, 1999). Si c'est le cas, ceci indique que la machinerie complexe qui s'assemble autour d'un site de fusion n'est pas un regroupement désordonné d'un grand nombre de protéines déstabilisant la membrane, mais que la fusion résulte de l'action concertée de plusieurs glycoprotéines au sein d'une organisation symétrique.

En conclusion, la compréhension des mécanismes de fusion passe maintenant par l'identification et la caractérisation des structures intermédiaires complexes composées des lipides et des glycoprotéines activées. Pour cela, il faut identifier des conditions dans lesquelles ces complexes, qui ont normalement des durées de vie très brèves, sont stabilisés

(Chernomordik *et al.*, 1998; Gaudin, 2000). La caractérisation de ces complexes à l'aide de la microscopie électronique sera alors envisageable. La reconstruction dans ces structures à basse résolution des glycoprotéines à partir des données de la radiocristallographie devrait permettre à terme de reconstituer le processus de fusion dans son intégralité.

4. REFERENCES

- ALLISON, S.L., SCHALICH, J., STIASNY, K., MANDL, C.W., KUNZ, C. & HEINZ F.X., 1995, Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J. Virol.* **69**:695-700.
- BAKER, K.A., DUTCH, R.E., LAMB, R.A. & JARDETZKY, T.S., 1999, Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol. Cell.* **3**:309-319.
- BIZEBARD, T., GIGANT, B., RIGOLET, B., RASMUSSEN, B., DIAT, O., BOSECKE, P., WHARTON, S.A., SKEHEL, J.J. & KNOSSOW, M., 1995, Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature* **376**:92-94.
- BLUMENTHAL, R., SARKAR, D.P., DURELL, S., HOWARD, D.E. & MORRIS, S.J., 1996, Dilation of the influenza hemagglutinin pore revealed by the kinetics of individual cell-cell fusion events. *J. Cell Biol.* **135**: 63-71.
- BULLOUGH, P.A., HUGHSON, F.M., SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C., 1994, Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**:37-43.
- CARR, C.M., CHAUDHRY, C. & KIM, P.S., 1997, Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:14306-14313.
- CHEN, J., SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C., 1999, N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:8967-8972.
- CHERNOMORDIK, L.V., FROLOV, V.A., LEIKINA, E., BRONK, P. & ZIMMERBERG, J., 1998, The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipid fusion pore formation. *J. Cell Biol.* **140**:1369-1382.
- CLEVERLEY, D.Z. & LENARD, J., 1998, The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3425-3430.
- DURELL, S.R., MARTIN, I., RUYSSCHAERT, J.M., SHAI, Y. & BLUMENTHAL, R., 1997, What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Mol. Membr. Biol.* **14**:97-112.
- FASS, D., HARRISON, S.C. & KIM, P.S., 1996, Retrovirus envelope domain at 1.7 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* **3**:465-469.
- GAUDIN, Y., TUFFEREAU, C., DURRER, P., BRUNNER, J., FLAMAND, A. & RUIGROK, R.W.H., 1999, Rabies virus-induced membrane fusion. *Mol. Membr. Biol.* **16**:21-31.
- GAUDIN, Y., 2000, Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *J. Cell Biol.* **150**:601-612.
- GIBBONS, D.L., AHN, A., CHATTERJEE, P.K. & KIELIAN M., 2000, Formation and characterization of the trimeric form of the fusion protein of Semliki Forest virus. *J. Virol.* **74**:7772-7780.
- KEMBLE, G.W., DANIELI, T. & WHITE, J.M., 1994, Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell* **76**:383-391.
- KOBE, B., CENTER, R.J., KEMP, B.E. & POUIMBOURIOS, P., 1999, Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:4319-4324.
- LEIKINA, E. & CHERNOMORDIK, L.V., 2000, Reversible merger of membranes at the early stage of influenza hemagglutinin-mediated fusion. *Mol. Biol. Cell* **11**:2359-2371.
- MELIKYAN, G.B., LIN, S., ROTH, M.G. & COHEN, F.S., 1999, Amino acid sequence requirements of the transmembrane and cytoplasmic domains of influenza virus hemagglutinin for viable membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* **10**:1821-1836.
- QIAO, H., PELLETIER, S.L., HOFFMAN, L., HACKER, J., ARMSTRONG, R.T. & WHITE, J.M., 1998, Specific single or double proline substitutions in the "spring-loaded" coiled-coil region of the influenza hemagglutinin impair or abolish membrane fusion activity. *J. Cell Biol.* **141**:1335-1347.
- QIAO, H., ARMSTRONG, R.T., MELIKYAN, G.B., COHEN, F.S. & WHITE, J.M., 1999, A specific point mutant at position 1 of the influenza hemagglutinin fusion peptide displays a hemifusion phenotype. *Mol. Biol. Cell* **10**:2759-2769.
- REY, F.A., HEINZ, F.X., MANDL, C., KUNZ, C. & HARRISON, S.C., 1995, The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**:291-298.
- RUIGROK, R.W.H., MARTIN, S.R., WHARTON, S.A., SKEHEL, J.J., BAYLEY, P.M. & WILEY, D.C., 1986, Conformational changes in the hemagglutinin of influenza virus which accompany heat-induced fusion of virus with liposomes. *Virology* **155**:484-497.
- STEGMANN, T., WHITE, J.M. & HELENIUS, A., 1990, Intermediates in influenza induced membrane fusion. *EMBO J.* **9**:4231-4241.
- SUTTON, R.B., FASSHAUER, D., JAHN, R. & BRÜNGER, A.T., 1998, Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**:347-353.
- TSURUDOME, M., GLÜCK, R., GRAF, R., FALCHETTO, R., SCHALLER, U. & BRUNNER, J., 1992, Lipid interactions of the hemagglutinin HA2 NH₂-terminal segment during influenza virus-induced membrane fusion. *J. Biol. Chem.* **267**:20225-20232.
- WEBER, T., PAESOLD, G., MISCHLER, R., SEMENZA, G. & BRUNNER, J., 1994, Evidence for H⁺-induced insertion of the influenza hemagglutinin HA2 N-terminal segment into the viral membrane. *J. Biol. Chem.* **269**:18353-18358.
- WEISSENHORN, W., DESSEN, A., HARRISON, S.C., SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C., 1997, Atomic structure

of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**: 426-430.

WEISSEHORN, W., CARFI, A., LEE, K.H., SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C., 1998, Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol. Cell* **2**:605-616.

WILSON, I.A., SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C., 1981, Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**: 366-373.