



# **Etude des interactions moléculaires entre protéines virales et protéines cellulaires dans la compréhension des mécanismes d'échappement, de pathogenèse et de transmissions interspécifiques.**

Damien Vitour

## **► To cite this version:**

Damien Vitour. Etude des interactions moléculaires entre protéines virales et protéines cellulaires dans la compréhension des mécanismes d'échappement, de pathogenèse et de transmissions interspécifiques.. Microbiologie et Parasitologie. Paris Est Créteil, 2019. <tel-04491741>

**HAL Id: tel-04491741**

**<https://hal.science/tel-04491741v1>**

Submitted on 6 Mar 2024

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

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



HAL Authorization

Inscription à l'Université Paris XII  
pour postuler au diplôme  
**d'Habilitation à Diriger les Recherches**

**Etude des interactions moléculaires entre protéines virales  
et protéines cellulaires dans la compréhension des  
mécanismes d'échappement, de pathogenèse et de  
transmissions interspécifiques**

Ecole Doctorale : ED 581 ABIES

Candidat : Dr Damien Vitour

UMR 1161 Virologie ANSES-INRA-ENVA

14 Rue Pierre et Marie Curie

94700 Maisons-Alfort cedex

Tél : 01 43 96 73 25

# Table des Matières

<b>Présentation du candidat</b>	<b>5</b>
1. Etat civil	5
2. Titres et diplômes	5
3. Distinctions	6
4. Parcours professionnel – Formations – Stages	6
5. Publications scientifiques	7
5.1 Publications originales dans des revues internationales à comité de lecture	7
5.2 Revues générales	12
5.3 Ouvrages	14
5.4 Communications orales à des congrès et conférences (*orateur, **invitation)	15
5.5 Brevets-valorisation	21
6. Encadrement scientifique	21
7. Expertises scientifiques	22
8. Enseignement	23
9. Contrats de recherche	23
<b>Evolution scientifique</b>	<b>24</b>
1. Parcours scientifique – Contexte de la recherche	24
2. Thématiques/travaux de recherche	26
2.1. Le virus de la FCO (Bluetongue virus, BTV)	26
2.1.1. Réponse innée anti-BTV	28
2.1.1.1. Induction de la synthèse d'IFN- $\alpha/\beta$ par le BTV	29
2.1.1.2. Régulation de la voie des IFN- $\alpha/\beta$ par le BTV	30
2.1.2. NS3 de BTV : une protéine multifonctionnelle	33
2.1.2.1. NS3 favorise le relargage du BTV	33
2.1.2.2. NS3 inhibe la synthèse des IFN- $\alpha/\beta$	35
2.1.2.3. NS3, un facteur de virulence essentiel du BTV	37
2.1.2.4. La protéine NS3 de BTV active la voie MAPK/ERK	37
2.1.3. Recherche de nouvelles interactions protéines-protéines entre le virus de la FCO et ses hôtes vecteur et mammifère	45
2.2. Le virus Schmallenberg (Schmallenberg virus, SBV)	50
2.2.1. Découverte	50
2.2.2. Classification	50

2.2.3. Signes cliniques et pathogenèse	51
2.2.4. NSs : un facteur de virulence essentiel du SBV	53
3. Perspectives	61
3.1 Interactomique & orbivirus	61
3.2 Immunité innée anti-BTV et banque innée	62
3.3 Mécanismes de transmission interspécifique et rôle de l'immunité innée	63
4. Bibliographie	67



# Abréviations

---

a.a. : Acide aminé

AD : activation domain

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AKAV : Akabane virus (virus Akabane)

AHSV : African horse sickness virus (virus de la peste équine)

ANR : Agence nationale de la recherche

ANRS : Agence nationale de recherche sur le Sida et les hépatites virales

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

ARN : acide ribonucléique

ARNdb : ARN double brin

ARNm : ARN messenger

ARNsb : ARN simple brin

BTV : Bluetongue virus (virus de la fièvre catarrhale ovine)

CHU : Centre hospitalier universitaire

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

DB : DNA-binding domain

DEA : Diplôme d'études approfondies

DEUST : Diplôme d'études universitaires scientifiques et techniques

EHDV : Epizootic Hemorrhagic Disease virus (virus de la maladie hémorragique épizootique)

EPHE : Ecole pratique des hautes études

ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

EVIR : Groupe Emergences virales des ruminants

FCO : Fièvre catarrhale ovine

I5 : Innate Immunity, Interactomics and Interspecies transmission of viral Infections

IBEID : Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases

IFN : interferon

IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  : I $\kappa$ B kinases  $\alpha/\beta$

IKK $\epsilon$  / IKBKE : Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon

INRA : Institut National de Recherche Agronomique  
INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale  
IRF : Interferon regulatory factor  
ISG : IFN stimulated gene  
JAK : Janus kinase  
MAVS : Mitochondrial antiviral-signaling protein  
MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated protein 5  
NEMO : NF-kappa-B essential modulator  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NS ou NSP : non structural protein  
OIE : Office international des épizooties  
ORF : Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)  
PAMP : pathogen associated molecular pattern  
PKR : protein kinase R  
PRR : pattern recognition receptor  
RIG-I : retinoic acid-inducible gene I  
RLR : RIG-I-like receptor  
SBV : Schmallenberg virus (virus Schmallenberg)  
SHAV : Shamonda virus (virus Shamonda)  
STAT : signal transducer and activator of transcription  
TBK1 : TANK-binding kinase 1  
TLR : Toll-like receptor  
TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$   
TYK : Tyrosine kinase  
UMR : Unité Mixte de Recherche  
VHC : Virus de l'hépatite C  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
VP : viral protein

# Présentation du candidat

## 1. Etat civil

*Nom* : VITOUR

*Prénoms* : Damien, Bertrand, Henri

*Né le* : 2 mai 1977 à Angers (49)

*Nationalité* : Française

Marié, 3 enfants

### Situation Actuelle

Chargé de projet virologie, ANSES

UMR1161 VIROLOGIE ANSES-INRA-ENVA

Laboratoire de Santé Animale,

14 Rue Pierre et Marie Curie,

94704 Maisons-Alfort, France

Tél : 01.43.96.73.30

E-mail : damien.vitour@vet-alfort.fr

## 2. Titres et diplômes

**2004**                      **Thèse de Doctorat d'Université** (Université Paris-Sud). Financement : bourse ministérielle. Mention très honorable.

**2001**                      **Diplôme d'études approfondies - DEA** (Université Paris-sud). Microbiologie : écologie microbienne, pathogénie des micro-organismes, agents anti-infectieux. Mention très bien, classé 1<sup>er</sup>/25.

**2000**                      **Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes - EPHE** (Université Paris Sorbonne) ; Option Biologie cellulaire et moléculaire. Mention très honorable.

**1997**                      **Diplôme d'Etudes Universitaires Scientifiques et Techniques - DEUST** (Université d'Angers) ; Option Microbiologie, Hygiène et Qualité. Classé 2<sup>ème</sup>/22.

**1995**                      **Baccalauréat scientifique** (Lycée du Sacré-Cœur, Angers).

### 3. Distinctions

**Lauréat du Diplôme d'études approfondies - DEA** (Université Paris-sud). Microbiologie : écologie microbienne, pathogénie des micro-organismes, agents anti-infectieux.

### 4. Parcours professionnel – Formations – Stages

2014-2019	<b>Responsable Jeune équipe (I5 - Innate Immunity, Interactomics and Interspecies transmission of viral Infections)</b> labellisée par le <b>LabEx IBEID</b> (P. Cossart, P. Sansonetti). UMR1161 Virologie ANSES-INRA-ENVA (Maisons-Alfort). <i>Groupe EVIR</i> (S. Zientara).
2012	<b>Certificat d'Aptitude à « l'Expérimentation animale niveau 1 ».</b>
Depuis juin 2009	<b>Chargé de projet virologie.</b> ANSES. UMR1161 Virologie ANSES-INRA-ENVA (Maisons-Alfort). <i>Groupe EVIR</i> (S. Zientara).
2009 (6 mois)	<b>Chercheur post-doctorant.</b> Financement : ANR. Unité Défense Innée et Inflammation (INSERM U874), Institut Pasteur (Paris). <i>Immunité innée antivirale en réponse à l'infection grippale</i> (M. Si-Tahar).
2005-2008	<b>Chercheur post-doctorant.</b> Financements : ANRS et bourse Roux (Institut Pasteur). Unité Hepacivirus et Immunité Innée, Institut Pasteur (Paris). <i>Etude du rôle de la voie de l'IFN lors de l'infection par le virus de l'hépatite C</i> (E. Meurs).
2001-2004	<b>Thèse de Doctorat d'Université</b> (Université Paris-Sud). UMR INRA-CNRS Virologie Moléculaire et Structurale (Gif-s-Yvette). <i>Interaction de la protéine non structurale NSP3 de rotavirus avec la protéine cellulaire RoXaN</i> (D. Poncet).
2002 (3mois)	<b>Cours de Virologie Fondamentale.</b> Institut Pasteur (Paris).
2000-2001	<b>DEA de Microbiologie</b> (Université Paris-sud). Unité de Virologie et Immunologie Moléculaire, INRA (Jouy-en-Josas). <i>Inhibition de la traduction des ARNm polyadénylés par la protéine NSP3 de rotavirus</i> (D. Poncet).
2000 (6 mois)	<b>Assistant de recherche clinique.</b> Laboratoire de Bactério-Virologie, CHU Angers. <i>Gestion d'un essai thérapeutique pour le traitement de patients infectés par le virus de l'hépatite C (VHC) : protocole multicentrique</i> (F. Lunel).
1998-1999	<b>Technicien de recherche.</b> Laboratoire de Bactério-Virologie, CHU Angers. <i>Quantification de la charge virale du VHC au cours du suivi thérapeutique de patients atteints d'hépatite chronique C</i> (F. Lunel).
1997-2000	<b>Diplôme de l'EPHE</b> (Université Paris Sorbonne). Laboratoire de Bactério-Virologie, CHU Angers. <i>Quantification sérique de l'ARN du</i>

*VHC : applications et implications dans le suivi thérapeutique de l'hépatite chronique C et chez les patients infectés par le VIH (F. Lunel, C. Payan).*

- 1997 (2 mois) **Stage de formation personnelle.** Ecole des sciences animales et microbiologiques, Université de Reading (UK). *Use of Baculoviruses as a Biological Control Agent of the Egyptian Cotton Leafworm Spodoptera littoralis (F. Hunter).*
- 1997 (4 mois) **Stage 2<sup>ème</sup> année DEUST Microbiologie.** Département d'Agriculture, Université de Reading (UK). *Utilisation de rhizobactéries du genre Pseudomonas comme agents de lutte biologique contre des nématodes phytopathogènes de plants de bananiers et de tomates (S. Gowen).*
- 1996 (2 mois) **Stage 1<sup>ère</sup> année DEUST Microbiologie.** Laboratoire de Bactério-Virologie, CHU Angers. *Recherche de mutations dans le gène pol du VIH-1 pendant traitement (C. Payan).*

## 5. Publications scientifiques

### 5.1 Publications originales dans des revues internationales à comité de lecture

47 publications internationales dont trois en premier auteur et sept en dernier auteur.

#### 2018

---

- ✓ Breard E, Gorlier A, Viarouge C, Donnet F, Sailleau C, Schulz C, Hoffmann B, Comtet L, Beer M, Zientara S, **Vitour D**. Evaluation of an IgM-specific ELISA for early detection of bluetongue virus infections in domestic ruminants sera. *Transbound Emerg Dis*. 2018 Nov 5.
- ✓ Sailleau C, Breard E, Viarouge C, Gorlier A, Leroux A, Hirchaud E, Lucas P, Blanchard Y, **Vitour D**, Grandcollot-Chabot M, Zientara S. Emergence of bluetongue virus serotype 4 in mainland France in November 2017. *Transbound Emerg Dis*. 2018 Jun 8.
- ✓ Bréard E, Schulz C, Sailleau C, Bernelin-Cottet C, Viarouge C, **Vitour D**, Guillaume B, Caignard G, Gorlier A, Attoui H, Gallois M, Hoffmann B, Zientara S, Beer M. Bluetongue virus serotype 27: Experimental infection of goats, sheep and cattle with three BTV-27 variants reveal atypical characteristics and likely direct contact transmission BTV-27 between goats. *Transbound Emerg Dis*. 2018 Apr;65(2):e251-e263.
- ✓ Courtejoie N, Durand B, Bréard E, Sailleau C, **Vitour D**, Zientara S, Gorlier A, Baurier F, Gourmelen C, Benoit F, Achour H, Milard C, Poliak S, Pagneux C, Viarouge C, Zanella G. Serological status for BTV-8 in French cattle prior to the 2015 re-emergence. *Transbound Emerg Dis*. 2018 Feb;65(1):e173-e182.
- ✓ Courtejoie N, Durand B, Bournez L, Gorlier A, Bréard E, Sailleau C, **Vitour D**, Zientara S, Baurier F, Gourmelen C, Benoit F, Achour H, Milard C, Poliak S, Pagneux C, Viarouge C,

Zanella G. Circulation of bluetongue virus 8 in French cattle, before and after the re-emergence in 2015. *Transbound Emerg Dis*. 2018 Feb;65(1):281-84.

✓ Sailleau C, Breard E, Viarouge C, Gorlier A, Quenault H, Hirchaud E, Touzain F, Blanchard Y, **Vitour D**, Zientara S. Complete genome sequence of bluetongue virus serotype 4 that emerged on the French island of Corsica in December 2016. *Transbound Emerg Dis*. 2018 Feb;65(1):e194-e197.

## 2017

---

✓ Breard E, Garnier A, Despres P, Blaise Boisseau S, Comtet L, Viarouge C, Bakkali-Kassimi L, Pourquier P, Hudelet P, **Vitour D**, Rossi S, Belbis G, Sailleau C, Zientara S. Development of a Double-Antigen Microsphere Immunoassay for Simultaneous Group and Serotype Detection of Bluetongue Virus Antibodies. *Transbound Emerg Dis*. 2017 Dec;64(6):1837-47.

✓ Laloy E, Bréard E, Trapp S, Pozzi N, Riou M, Barc C, Breton S, Delaunay R, Cordonnier N, Château-Joubert S, Crochet D, Gouzil J, Hébert T, Raimbourg M, Viarouge C, **Vitour D**, Durand B, Ponsart C, Zientara S. Fetopathic effects of experimental Schmallenberg virus infection in pregnant goats. *Vet Microbiol*. 2017 Nov;211:141-49.

✓ Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, **Vitour D**, Romey A, Garnier A, Fablet A, Lowenski S, Gorna K, Caignard G, Pagneux C, Zientara S. Re-Emergence of Bluetongue Virus Serotype 8 in France, 2015. *Transbound Emerg Dis*. 2017 Jun;64(3):998-1000.

✓ Sailleau C, Viarouge C, Breard E, **Vitour D**, Zientara S. Ring trial 2016 for Bluetongue virus detection by real-time RT-PCR in France. *Vet Med Sci*. 2017 Apr 16;3(2):107-114.

## 2016

---

✓ Gouzil J, Fablet A, Lara E, Caignard G, Cochet M, Kundlacz C, Palmarini M, Varela M, Breard E, Sailleau C, Viarouge C, Couplier M, Zientara S, **Vitour D**. Nonstructural Protein NSs of Schmallenberg Virus Is Targeted to the Nucleolus and Induces Nucleolar Disorganization. *J Virol*. 2016 Dec 16;91(1).

✓ Schulz C, Bréard E, Sailleau C, Jenckel M, Viarouge C, **Vitour D**, Palmarini M, Gallois M, Höper D, Hoffmann B, Beer M, Zientara S. Bluetongue virus serotype 27: detection and characterization of two novel variants in Corsica, France. *J Gen Virol*. 2016 Sep;97(9):2073-83.

✓ Pourcelot M, Zemirli N, Silva Da Costa L, Loyant R, Garcin D, **Vitour D**, Munitic I, Vazquez A, Arnould D. The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing. *BMC Biol*. 2016 Aug 18;14:69.

✓ Bréard E, Sailleau C, Quenault H, Lucas P, Viarouge C, Touzain F, Fablet A, **Vitour D**, Attoui H, Zientara S, Blanchard Y. Complete Genome Sequence of Bluetongue Virus Serotype 8, Which Reemerged in France in August 2015. *Genome Announc*. 2016 Apr 14;4(2).

## 2015

---

✓ Ftaich N, Cancia C, Viarouge C, Barry G, Ratinier M, van Rijn PA, Breard E, **Vitour D**, Zientara S, Palmarini M, Terzian C, Arnaud F. Turnover Rate of NS3 Proteins Modulates Bluetongue Virus Replication Kinetics in a Host-Specific Manner. *J Virol*. 2015 Oct;89(20):10467-81.

- ✓ Sailleau C, Viarouge C, Bréard E, Perrin JB, Doceul V, **Vitour D**, Zientara S. Emergence of Bluetongue Virus Serotype 1 in French Corsica Island in September 2013. *Transbound Emerg Dis*. 2015 Oct;62(5):e89-91.
- ✓ Zientara S, Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Doceul V, **Vitour D**. Benefits of PCR and decentralization of diagnosis in regional laboratories in the management of Bluetongue in France. *Vet Ital*. 2015 Oct-Dec;51(4):393-9.
- ✓ Viarouge C, Breard E, Zientara S, **Vitour D**, Sailleau C. Duplex Real-Time RT-PCR Assays for the Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus. *PLoS One*. 2015 Jul 10;10(7):e0132540.
- ✓ Breard E, Belbis G, Viarouge C, Nomikou K, Haegeman A, De Clercq K, Hudelet P, Hamers C, Moreau F, Lilin T, Durand B, Mertens P, **Vitour D**, Sailleau C, Zientara S. Evaluation of adaptive immune responses and heterologous protection induced by inactivated bluetongue virus vaccines. *Vaccine*. 2015 Jan 15;33(4):512-8.

## 2014

---

- ✓ Zientara S, Sailleau C, Viarouge C, Höper D, Beer M, Jenckel M, Hoffmann B, Romey A, Bakkali-Kassimi L, Fablet A, **Vitour D**, Bréard E. Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2014 Dec;20(12):2123-5.
- ✓ Viarouge C, Lancelot R, Rives G, Bréard E, Miller M, Baudrimont X, Doceul V, **Vitour D**, Zientara S, Sailleau C. Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. *Vet Microbiol*. 2014 Nov 7;174(1-2):78-85.
- ✓ Doceul V, Chauveau E, Lara E, Bréard E, Sailleau C, Zientara S, **Vitour D**. Dual modulation of type I interferon response by bluetongue virus. *J Virol*. 2014 Sep;88(18):10792-802.
- ✓ Mohd Jaafar F, Belhouchet M, **Vitour D**, Adam M, Breard E, Zientara S, Mertens PP, Attoui H. Immunisation with bacterial expressed VP2 and VP5 of bluetongue virus (BTV) protect  $\alpha/\beta$  interferon-receptor knock-out (IFNAR(-/-)) mice from homologous lethal challenge. *Vaccine*. 2014 Jul 7;32(32):4059-67.
- ✓ Ponsart C, Pozzi N, Bréard E, Catinot V, Viard G, Sailleau C, Viarouge C, Gouzil J, Beer M, Zientara S, **Vitour D**. Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen. *Vet Res*. 2014 Apr 4;45:37.

## 2013

---

- ✓ Sailleau C, Boogaerts C, Meyrueix A, Laloy E, Bréard E, Viarouge C, Desprat A, **Vitour D**, Doceul V, Boucher C, Zientara S, Nicolier A, Grandjean D. Schmallenberg virus infection in dogs, France, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2013 Nov;19(11).
- ✓ Breard E, Belbis G, Viarouge C, Riou M, Desprat A, Moreau J, Laloy E, Martin G, Sarradin P, **Vitour D**, Batten C, Doceul V, Sailleau C, Zientara S. Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 experimentation on adult cattle. *Res Vet Sci*. 2013 Oct;95(2):794-8.
- ✓ Ruscanu S, Jouneau L, Urien C, Bourge M, Lecardonnel J, Moroldo M, Loup B, Dalod M, Elhmouzi-Younes J, Bevilacqua C, Hope J, **Vitour D**, Zientara S, Meyer G, Schwartz-Cornil I. Dendritic cell subtypes from lymph nodes and blood show contrasted gene expression programs upon Bluetongue virus infection. *J Virol*. 2013 Aug;87(16):9333-43.

✓ Chauveau E, Doceul V, Lara E, Breard E, Sailleau C, Vidalain PO, Meurs EF, Dabo S, Schwartz-Cornil I, Zientara S, **Vitour D**. NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *J Virol*. 2013 Jul;87(14):8241-6.

✓ Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Desprat A, Doceul V, Lara E, Languille J, **Vitour D**, Attoui H, Zientara S. Acute Schmallenberg virus infections, France, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2013 Feb;19(2):321-2.

✓ Bréard E, Lara E, Comtet L, Viarouge C, Doceul V, Desprat A, **Vitour D**, Pozzi N, Cay AB, De Regge N, Pourquier P, Schirrmeier H, Hoffmann B, Beer M, Sailleau C, Zientara S. Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *PLoS One*. 2013;8(1):e53446.

## 2012

---

✓ Chauveau E, Doceul V, Lara E, Adam M, Breard E, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Meyer G, Schwartz-Cornil I, Ruscanu S, Charley B, Zientara S, **Vitour D**. Sensing and control of bluetongue virus infection in epithelial cells via RIG-I and MDA5 helicases. *J Virol*. 2012 Nov;86(21):11789-99.

✓ Zientara S, Amat JP, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, **Vitour D**, Bréard E. Difficulties in the interpretation of bluetongue RT-PCR results in France. *Vet Rec*. 2012 Jun 9;170(23):599.

✓ Ruscanu S, Pascale F, Bourge M, Hemati B, Elhrouzi-Younes J, Urien C, Bonneau M, Takamatsu H, Hope J, Mertens P, Meyer G, Stewart M, Roy P, Meurs EF, Dabo S, Zientara S, Breard E, Sailleau C, Chauveau E, **Vitour D**, Charley B, Schwartz-Cornil I. The double-stranded RNA bluetongue virus induces type I interferon in plasmacytoid dendritic cells via a MYD88-dependent TLR7/8-independent signaling pathway. *J Virol*. 2012 May;86(10):5817-28.

✓ Sailleau C, Zanella G, Breard E, Viarouge C, Desprat A, **Vitour D**, Adam M, Lasne L, Martrenchar A, Bakkali-Kassimi L, Costes L, Zientara S. Co-circulation of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses in cattle in Reunion Island. *Vet Microbiol*. 2012 Mar 23;155(2-4):191-7.

## 2011

---

✓ **Vitour D**, Guillotin J, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Wolff F, Belbis G, Durand B, Bakkali-Kassimi L, Breard E, Zientara S, Zanella G. Colostral antibody induced interference of inactivated bluetongue serotype-8 vaccines in calves. *Vet Res*. 2011 Feb 2;42(1):18.

✓ Pothlichet J, Niewold TB, **Vitour D**, Solhonne B, Crow MK, Si-Tahar M. A loss-of-function variant of the antiviral molecule MAVS is associated with a subset of systemic lupus patients. *EMBO Mol Med*. 2011 Mar;3(3):142-52.

## 2009

---

✓ **Vitour D**, Dabo S, Ahmadi Pour M, Vilasco M, Vidalain PO, Jacob Y, Mezel-Lemoine M, Paz S, Arguello M, Lin R, Tangy F, Hiscott J, Meurs EF. Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS. *J Biol Chem*. 2009 Aug 14;284(33):21797-809.



## 2008

---

✓ Harb M, Becker MM, **Vitour D**, Baron CH, Vende P, Brown SC, Bolte S, Arold ST, Poncet D. Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J Virol*. 2008 Nov;82(22):11283-93.

## 2007

---

✓ Le Goffic R, Pothlichet J, **Vitour D**, Fujita T, Meurs E, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol*. 2007 Mar 15;178(6):3368-72.

## 2006

---

✓ Vilasco M, Larrea E, **Vitour D**, Dabo S, Breiman A, Regnault B, Riezu JJ, Eid P, Prieto J, Meurs EF. The protein kinase IKKepsilon can inhibit HCV expression independently of IFN and its own expression is downregulated in HCV-infected livers. *Hepatology*. 2006 Dec;44(6):1635-47.

✓ Breiman A, **Vitour D**, Vilasco M, Ottone C, Molina S, Pichard L, Fournier C, Delgrange D, Charneau P, Duverlie G, Wychowski C, Maurel P, Meurs EF. A hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease-dependent strategy for the identification and purification of HCV-infected cells. *J Gen Virol*. 2006 Dec;87(Pt 12):3587-98.

✓ Lin R, Lacoste J, Nakhaei P, Sun Q, Yang L, Paz S, Wilkinson P, Julkunen I, **Vitour D**, Meurs E, Hiscott J. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol*. 2006 Jun;80(12):6072-83.

## 2004

---

✓ **Vitour D**, Lindenbaum P, Vende P, Becker MM, Poncet D. RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *J Virol*. 2004 Apr;78(8):3851-62.

## 1999

---

✓ Fialaire P, Payan C, **Vitour D**, Chennebault JM, Loison J, Pichard E, Lunel F. Sustained disappearance of hepatitis C viremia in patients receiving protease inhibitor treatment for human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 1999 Aug;180(2):574-5.

✓ Cresta P, Musset L, Cacoub P, Frangeul L, **Vitour D**, Poynard T, Opolon P, Nguyen DT, Golliot F, Piette JC, Huraux JM, Lunel F. Response to interferon alpha treatment and disappearance of cryoglobulinaemia in patients infected by hepatitis C virus. *Gut*. 1999 Jul;45(1):122-8.

✓ Lunel F, Cresta P, **Vitour D**, Payan C, Dumont B, Frangeul L, Reboul D, Brault C, Piette JC, Huraux JM. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and monitor assays. *Hepatology*. 1999 Feb;29(2):528-35.

1998

---

✓ Aalten P.M., **Vitour D.**, Blanvillain D., Gowen S.R., Sutra L. Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant-parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. *Letters in Applied Microbiology*. 1998;27:257-61.

## 5.2 Revues générales à comité de lecture

2017

---

✓ Zientara S, Sailleau C, Breard E, **Vitour D**, Viarouge C, Belbis G, Gorna K, Relmy A, Romey A, Blaise Boisseau S, Cardinale E, Bakkali-Kassimi L. Emergence et ré-émergence de deux dangers sanitaires de catégorie 1 en France (FCO) et à Maurice (FA). *Bull Acad Vét France*. 2017, 170(1).

2016

---

✓ Marianneau P, **Vitour D**, Gouzil J, Doceul V, Zientara S. Données virologiques et épidémiologiques récentes sur les orthobunyavirus humains et animaux : conséquences sur les risques de diffusion et d'introduction de nouvelles maladies. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*. 2016 (76):22-4.

✓ Sailleau C, Bournez L, Bréard E, Viarouge C, Cavalerie L, **Vitour D**, Zientara S. Réémergence de la fièvre catarrhale ovine en France, en septembre 2015. *Epidémiol. et santé anim*. 2016, 69:1-8.

✓ Zientara S, Viarouge C, Fablet A, **Vitour D**, Belbis G, Bréard E, Bournez L, Sailleau C. Ré-émergence du virus de la fièvre catarrhale ovine en France. *Renc. Rech. Ruminants*. 2016, 23:327-30.

2015

---

✓ Bernelin-Cottet C, Garnier A, Sailleau C, Viarouge C, Romey A, Fablet A, **Vitour D**, Bréard E, Zientara S. Identification d'un nouveau virus de la fièvre catarrhale ovine chez des chèvres en Corse en 2014. *Epidémiol. et santé anim*. 2015, 67:119-24.

✓ Belbis G, Bréard E, Sailleau C, Viarouge C, **Vitour D**, Zientara S. Fièvre catarrhale ovine en Europe et dans le Bassin méditerranéen : situation actuelle et expérience acquise des émergences précédentes. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*. 2015 (66):75-9.

✓ **Vitour D**, Doceul V, Schwartz-Cornil I, Zientara S. Induction et modulation de la voie interféron de type I au cours de l'infection par le virus de la fièvre catarrhale ovine. *Virologie* 2015, 19(4):178-86.

2014

---

✓ **Vitour D**, Doceul V, Ruscanu S, Chauveau E, Schwartz-Cornil I, Zientara S. Induction and control of the type I interferon pathway by Bluetongue virus. *Virus Res*. 2014 Mar;182:59-70.

## 2013

---

✓ **Vitour D**, Doceul V, Chauveau E, Lara E, Zientara S. Induction et modulation de la synthèse d'interféron de type I par le BTV. *Bull Acad Vét France*. 2013;166(3):252-60.

✓ Doceul V, Lara E, Sailleau C, Belbis G, Richardson J, Bréard E, Viarouge C, Dominguez M, Hendrikx P, Calavas D, Desprat A, Languille J, Comtet L, Pourquier P, Eléouët JF, Delmas B, Marianneau P, **Vitour D**, Zientara S. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *Vet Res*. 2013 May 15;44:31.

✓ Viarouge C, Sailleau C, Rives G, Desprat A, Bréard E, Miller M, Baudrimont X, Lancelot R, **Vitour D**, Zientara S. Identification et caractérisation des virus de la fièvre catarrhale ovine et de la maladie hémorragique épizootique en Guyane en 2011 et 2012. *Epidémiol. et santé anim*. 2013, 63:127-139.

## 2012

---

✓ Lara E, Bréard E, Doceul V, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Adam M, Chauveau E, **Vitour D**, Dominguez M, Zientara S. L'Europe du Nord: une nouvelle terre d'émergence pour les arboviroses? *Virologie*. 2012;16(2): 67-72.

✓ **Vitour D**, Lara E, Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Desprat A, Doceul V, Chauveau E, Adam M, Dominguez M, Zientara S. Emergence du virus Schmallenberg dans le Nord de l'Europe. *Epidémiol. et santé anim*. 2012, 61:51-8.

✓ Zientara S, **Vitour D**, Lecollinet S. Prévention vaccinale de deux maladies émergentes à vecteur : la fièvre catarrhale du mouton et l'infection à virus West Nile. *Bull Acad Natl Med*. 2012 Mar;196(3):591-601.

✓ Zientara S, Languille J, Pelzer S, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, **Vitour D**, Dominguez M, Bréard E. Nouvelle émergence dans le Nord de l'Europe: le virus Schmallenberg. *Le Point Vétérinaire*. 2012 Mars.n°323;54-8.

✓ Zientara S, Languille J, Pelzer S, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Bréard E, Dominguez M, **Vitour D**. Un virus émergent dans le nord de l'Europe : le virus Schmallenberg. *Proceedings Journées 3R*, Rencontre Recherche Ruminants, Paris (France), 5-6 décembre 2012.

✓ **Vitour D**, Lara E, Bréard E, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Belbis G, Zientara S. Une nouvelle arbovirose émergente en Europe: l'infection par le virus Schmallenberg. *Le nouveau praticien vétérinaire*. 2012;5(20):19-23.

✓ Zientara S, Lara E, Bréard E, Doceul V, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Adam M, Chauveau E, **Vitour D**. 2012. Une nouvelle émergence dans le nord de l'Europe. Recueil des conférences des GTV.

## 2011

---

✓ **Vitour D**. Etude du virus de la fièvre catarrhale ovine par un système de génétique inverse. *Le Point Vétérinaire*. 2011 Mars;n°315:8-9.

✓ **Vitour D**, Amat J-P, Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Desprat A, Zientara S. Epidémiologie: la fièvre catarrhale ovine en France et en Europe. *Le nouveau praticien vétérinaire*. 2011;4(18):57-62.

## 2010

---

✓ **Vitour D**, Guillotin J, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Wolff F, Belbis G, Durand B, Bakkali-Kassimi L, Bréard E, Zientara S, Zanella G. Interférence des anticorps maternels avec la réponse des veaux à la vaccination par un vaccin inactivé contre le sérotype 8 du virus de la fièvre catarrhale ovine. *Epidémiol. et santé anim*. 2010, 58:123-32.

✓ Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Desprat A, **Vitour D**, Adam M, Lasne L, Martrenchar A, Costes L, Zientara S, Zanella G. Co-circulation des virus de la maladie hémorragique des cervidés et de la fièvre catarrhale ovine à la Réunion en 2009. *Epidémiol. et santé anim*. 2010, 57 :21-29.

## 2009

---

✓ **Vitour D**, Sailleau C, Bréard E, Zientara S. Identification and characterization of Orbivirus isolates from La Réunion and Martinique Islands. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, tome LXII, n° 2-4, 149.

## 2008

---

✓ Bouttier M., Goncalvès C., Journo C., Letienne J., Pina M., **Vitour D**. Virus et interferon: mécanismes d'induction et stratégies d'échappement. *Virologie*. 2008, 12(3):159-73.

## 2007

---

✓ **Vitour D**, Meurs EF. Regulation of interferon production by RIG-I and LGP2: a lesson in self-control. *Sci STKE*. 2007 May 1;2007(384):pe20.

## 5.3 Ouvrages

✓ Belbis G, Zientara S, Bréard E, Sailleau C, Caignard G, **Vitour D**, Attoui H. Bluetongue virus: from BTV-1 to BTV-27. *Adv Virus Res*. 2017;99 :161-197. In Loeffler's Footsteps – Discoveries in the Era of Genomics. Edited by Martin Beer & Dirk Höper.

✓ Doceul C, Wernike K, **Vitour D**, Laloy E. Schmallenberg virus. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock. 2017. In: Bayry J. Eds: Springer. pp99-120.

✓ Doceul C, Gouzil J, **Vitour D**, Zientara S (March 2015). Schmallenberg virus. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

✓ Becker M.M., Arold S.T., Burley S.K., Deo R.C., Groft C.M., **Vitour D**, Poncet D. Function and structure of rotavirus NSP3. *Structure and Molecular Biology of Segmented*

Double-Stranded RNA Viruses. 2008. In: Patton J.T., Nibert M.L. Eds: Horizon Scientific Press.

## 5.4 Communications orales à des congrès et conférences (\*orateur, \*\*invitation)

### 2018

---

✓ **Vitour D\*\***. Etude des interactions moléculaires pour le virus de la fièvre catarrhale ovine. Journées scientifiques et doctorales Anses. Maisons-Alfort (France), 5-6 décembre 2018.

✓ **Vitour D\***, Kundlacz C, Fablet A, Amaral Da Silva Moraes R, Pourcelot M, Sailleau C, Viarouge C, Bréard E, Zientara S, Caignard G. Study of molecular interactions between BTV and its hosts. 13th International dsRNA Symposium. Houffalize (Belgium), 24-28 September 2018.

✓ Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Gorlier A, Leroux A, Hirchaud E, Lucas P, Blanchard Y, **Vitour D**, Grancollot M, Zientara S\*. Emergence of Bluetongue virus serotype 4 in France in November 2017. 12th Annual Meeting of EPIZONE. Vienna (Austria), 27-30 August 2018.

✓ Caignard G\*, Kundlacz C, Fablet A, Pourcelot M, Amaral Da Silva Moraes R, Morin-Dewaele M, Sailleau C, Viarouge C, Bréard E, Zientara S, **Vitour D**. Virus-host interactome high-throughput mapping: from the identification of new factors of pathogenicity and interspecies transmission to new therapeutic targets for an animal arbovirus. IDMIT and DIM1Health Symposium. CEA, Fontenay-aux-Roses (France), 27-28 June 2018.

✓ Kundlacz C\*, Fablet A, Amaral Da Silva Moraes R, Morin-Dewaele M, Sailleau C, Viarouge C, Bréard E, Gorlier A, Zientara S, Caignard G, **Vitour D**. Impact du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine sur la voie de signalisation MAPK/ERK. Journée des doctorants, post-doctorants et masteriens. ENVA, Maisons-Alfort (France), 5 juin 2018.

✓ Morin-Dewaele M\*, Amaral Da Silva Moraes R, Kundlacz C, Fablet A, Sailleau C, Viarouge C, Bréard E, Gorlier A, Zientara S, Caignard G, **Vitour D**. Caractérisation de l'interaction entre la protéine NS3 du virus de la fièvre catarrhale ovine et la protéine cellulaire GBP2. Journée des doctorants, post-doctorants et masteriens. ENVA, Maisons-Alfort (France), 5 juin 2018.

### 2017

---

✓ Blaise-Boisseau S\*, Laloy E, Hägglund S, Näslund K, Bach S, Caignard G, Romey A, Relmy A, Gorna K, Kundlacz C, **Vitour D**, Zientara S, Valarcher JF, Bakkali-Kassimi L. FMDV - Host interaction in a model of persistently infected bovine cells. 11<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE, Paris (France), 20-21 septembre 2017.

✓ Kundlacz C\*, Caignard G, Fablet A, Pourcelot M, Zientara S, **Vitour D**. Impact of Bluetongue virus on the MAPK/ERK pathway. 11<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE, Paris (France), 20-21 septembre 2017.

✓ Caignard G\*, Kundlacz C, Fablet A, Jacob Y, Hirchaud E, Touzain F, Lucas P, Blanchard Y, Pourcelot M, Zientara S, **Vitour D**. Interactomic high-throughput mapping for bluetongue virus in its natural hosts to identify new factors of pathogenicity and interspecies transmission. 11<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE, Paris (France), 20-21 septembre 2017.

✓ Caignard G\*, Kundlacz C, Fablet A, Jacob Y, Hirchaud E, Touzain F, Lucas P, Blanchard Y, Pourcelot M, Zientara S, **Vitour D**. Cartographie à haut débit des interactions virus-hôte pour identifier de nouveaux facteurs de pathogénicité et de franchissement de barrière d'espèces pour une arbovirose animale. Journée de la recherche, ENVA, Maisons-Alfort (France), 27 juin 2017.

✓ Lacour S\*, Lemasson M, Unterfinger Y, Moutailler S, Bonnet S, Bell-Sakyo L, Caignard G, **Vitour D**, Couplier M, Attoui H, Richardson J. Cartographie des interactions protéiques entre les flavivirus transmis par les tiques et leurs hôtes mammifères. Journée de la recherche, ENVA, Maisons-Alfort (France), 27 juin 2017.

✓ Zientara S\*, Bournez L, Bréard E, Viarouge C, Blanchard Y, **Vitour D**, Attoui H, Sailleau C. Re-emergence of Bluetongue serotypes 4 and 8 in Corsica and in continental France in 2016: consequences for Bluetongue diagnosis. International symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians, Sorrento (Italie), 7-10 juin 2017.

✓ Zientara S\*, Bournez L, Bréard E, Zanella G, Viarouge C, Blanchard Y, Quenault H, Touzain F, **Vitour D**, Attoui H, Cavalerie L, Sailleau C. Réémergence de la fièvre catarrhale ovine (sérotypes 4 et 8) en France en Septembre 2015 et 2016. 19<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris (France), 30-31 mars 2017.

## 2016

---

✓ Kundlacz C\*, Caignard G, Fablet F, Zientara S, **Vitour D**. Réunion des laboratoires de référence de l'Union Européenne sur la FCO et la peste équine, Madrid (Espagne), 17-18 novembre 2016.

✓ Zientara S\*, Bournez L, Bréard E, Viarouge C, Blanchard Y, Quenault H, Touzain F, **Vitour D**, Attoui H, Cavalerie L, Sailleau C. Re-emergence of Bluetongue serotype 8 in France in September 2015. Réunion des laboratoires de référence de l'Union Européenne sur la FCO et la peste équine, Madrid (Espagne) 17-18 novembre 2016.

✓ Zientara S\*, Bournez L, Bréard E, Viarouge C, Blanchard Y, Quenault H, Touzain F, **Vitour D**, Attoui H, Cavalerie L, Sailleau C. Re-emergence of Bluetongue serotype 8 in France in September 2015. 4<sup>th</sup> Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Prague (République tchèque), 7-9 novembre 2016.

✓ Blaise-Boisseau S\*, Laloy E, Hägglund S, Näslund K, Bach S, Caignard G, Romey A, Relmy A, Gorna K, Kundlacz C, **Vitour D**, Zientara S, Valarcher JF, Bakkali-Kassimi L. Host interaction in a model of persistently infected bovine cells. FMDV- Host interaction in a model of persistently infected bovine cells. Congrès open session FMD, Cascais (Portugal), 26-28 octobre 2016

✓ Caignard G\*, Kundlacz C, Fablet F, Zientara S, **Vitour D**. Virus-host interactome high-throughput mapping: from the identification of new factors of pathogenicity and interspecies transmission to new therapeutic targets for an animal arbovirus. 6<sup>th</sup> European Congress of Virology, Hambourg (Allemagne), 19-22 octobre 2016.

✓ Zientara S\*, Bournez L, Bréard E, Viarouge C, **Vitour D**, Attoui H, Sailleau C. Re-emergence of Bluetongue serotype 8 in France in September 2015. 10<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE, Madrid (Espagne), 27-29 septembre 2016.

✓ Blaise-Boisseau S\*, Laloy E, Hägglund S, Näslund K, Bach S, Caignard G, Romey A, Relmy A, Gorna K, Kundlacz C, **Vitour D**, Zientara S, Valarcher JF, Bakkali-Kassimi L. Host interaction in a model of persistently infected bovine cells. FMDV- Host interaction in a model of persistently infected bovine cells. Conference on "Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences", St Andrews (Grande-Bretagne), 24-26 août 2016.

✓ **Vitour D**\*\*. Mechanisms of induction and control of the type I interferon pathway by bluetongue virus. Kick-off Meeting du Pôle de Recherche en Infectiologie de l'UNamur, Namur (Belgique), 18 mai 2016.

✓ Caignard G\*, Kundlacz C, Fablet F, Zientara S, **Vitour D**. Cartographie à haut débit des interactions virus-hôte pour identifier de nouveaux facteurs de pathogénicité et de franchissement de barrière d'espèces pour une arbovirose virale. 18<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris (France), 24-25 mars 2016.

✓ Sailleau C\*, Bournez L, Bréard E, Viarouge C, Cavalerie L, **Vitour D**, Zientara S. Réémergence de la fièvre catarrhale ovine en France en Septembre 2015. Journées de l'AEEMA, Maisons-Alfort (France), 24-25 mars 2016.

## 2015

---

✓ Gouzil J\*, Fablet A, Caignard G, Kundlacz C, Vidalain PO, Tangy F, Zientara S, **Vitour D**. Study of the nuclear targeting of the NSs protein of Schmallenberg virus. 9<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE, Montpellier (France), 3 septembre 2015.

✓ Gouzil J\*, Fablet A, Caignard G, Vidalain PO, Tangy F, **Vitour D**, Zientara S. Etude des propriétés biochimiques et fonctionnelles du facteur de virulence NSs du virus Schmallenberg (SBV). 17<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris (France), 9-10 avril 2015.

✓ Zientara S\*, Sailleau C, Viarouge C, Hoper D, Beer M, Jenckel M, Hoffmann B, Fablet A, **Vitour D**, Bréard E. Identification d'un nouveau virus de la fièvre catarrhale ovine chez des chèvres en Corse en 2014. 17<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris (France), 9-10 avril 2015.

## 2014

---

✓ **Vitour D**\*\*. L'analyse générique des interactions protéiques hôte-pathogène. BIG DATA : une évolution, une révolution, une promesse pour le diagnostic, Université Paris-Est, Créteil (France), 27 novembre 2014.

✓ **Vitour D\*\***. Immunité innée et interactions virus-hôte autour des virus Bluetongue et Schmallenberg : histoires différentes et destins croisés. Cycles de séminaires : Immunité innée et virus : Jeunes talents, Faculté des Saints-Pères, Paris (France), 12 novembre 2014.

✓ Ftaich\* N, Ciancia C, Viarouge C, Barry G, Ratinier M, Bailly-Bechet M, Van Rijn PA, Bréard E, **Vitour D**, Zientara S, Palmarini M, Terzian C, Arnaud F. Role of the NS3 protein in modulating Bluetongue virus-host interactions. 4<sup>th</sup> International Conference on Orbiviruses, Rome (Italie), 4-7 novembre 2014.

✓ Doceul V, Chauveau E, Lara E, Bréard E, Sailleau C, Zientara S and **Vitour D\***. Bluetongue virus interferes with the type I interferon response. 4<sup>th</sup> International Conference on Orbiviruses, Rome (Italie), 4-7 novembre 2014.

✓ Zientara S\*, Viarouge C, Bréard E, Hoepfer D, Beer M, Hoffmann B, **Vitour D**, Doceul V, Clément T, Perrin JB, Sailleau C. Emergence of Bluetongue virus in Corsica in 2013. 8<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE, Copenhagen (Danemark), 23-25 septembre 2014.

✓ Gouzil J\*, Vidalain PO, Garnier A, Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Tangy F, Zientara S, **Vitour D**. Interaction of Schmallenberg Virus NSs Virulence Factor with the Cellular Major Vault Protein. 33rd Annual Meeting of the American Society for Virology, Fort Collins, Colorado (Etats-Unis), 21-25 juin 2014.

## 2013

---

✓ Doceul V\*, Zientara S, **Vitour D**. Modulation de la voie de réponse interféron par le virus de la fièvre catarrhale ovine. Journées d'animation scientifique du département Santé animale de l'INRA, Cap d'Agde (France), 15-18 octobre 2013.

✓ **Vitour D\***, Doceul V, Gouzil J, Chauveau E, Sailleau C, Breard E, Zientara S. NS3 of Bluetongue virus interferes with the innate antiviral response. 7<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE « Nothing permanent, except change », Bruxelles (Belgique), 1-4 octobre 2013.

✓ Doceul V\*, Chauveau E, Lara E, Zientara S, **Vitour D**. Modulation of the interferon signaling pathway by Bluetongue virus. 5<sup>th</sup> European Congress of Virology, Lyon (France), 11-14 septembre 2013.

✓ Zientara S\*, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Lara E, Gouzil J, Bréard E, Beck C, Lecollinet S, **Vitour D**. Un virus émergent dans le nord et l'ouest de l'Europe : le virus Schmallenberg. Forum santé, La Réunion (France), 11-13 juin 2013.

✓ Zientara S, **Vitour D\*\***. Immunité innée et infection par le virus de la Fièvre Catarrhale Ovine, Académie Vétérinaire de France, Paris (France), 6 juin 2013.

✓ Viarouge C\*, Sailleau C, Rives G, Desprat A, Bréard E, Miller M, Baudrimont X, Lancelot R, **Vitour D**, Zientara S. Identification et caractérisation des virus de la fièvre catarrhale ovine et de la maladie hémorragique épizootique en Guyane en 2011 et 2012. Journées de l'AEEMA, Maisons-Alfort (France), 30-31 mai 2013.



## 2012

---

✓ Chauveau E\*, Lara E, Doceul V, Adam M, Sailleau C, Bréard E, Desprat A, Viarouge C, Zientara S, **Vitour D**. Le virus de la fièvre catarrhale ovine induit une réponse antivirale innée via les ARN hélicases RIG-I et MDA5. Journée des Doctorants et Post-doctorants de l'ANSES, Maisons-Alfort (France), 22 octobre 2012.

✓ Lara E\*, Doceul V, Chauveau E, Adam M, Sailleau C, Bréard E, Desprat A, Viarouge C, Zientara S, **Vitour D**. La protéine hGBP2, interagissant potentiellement avec la protéine NS3 du virus de la fièvre catarrhale ovine. Journée des Doctorants et Post-doctorants de l'ANSES, Maisons-Alfort (France), 22 octobre 2012.

✓ Doceul V\*, Chauveau E, Lara E, Adam M, Bréard E, Sailleau C, Schwartz-Cornil I, Zientara S, **Vitour D**. Modulation de la réponse interféron par le virus de la fièvre catarrhale ovine. Journée des Doctorants et Post-doctorants de l'ANSES, Maisons-Alfort (France), 22 octobre 2012.

✓ Lara E\*, Bréard E, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Adam M, Doceul V, Chauveau E, Eléouët JF, Delmas B, **Vitour D**, Zientara S. Development of a reverse genetics system for the Schmallenberg virus. IX International Congress of Veterinary Virology, Madrid (Espagne), 4-7 septembre 2012.

✓ Doceul V\*, Chauveau E, Lara E, Adam M, Bréard E, Sailleau C, Schwartz-Cornil I, Zientara S, **Vitour D**. Sensing and control of Bluetongue virus infection in epithelial cells via RIG-I and MDA5 helicases. 6<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE « Viruses on the move », Brighton (Grande-Bretagne), 12-14 juin 2012.

✓ Zientara S\*, Lara E, Bréard E, Viarouge C, Desprat A, **Vitour D**, Adam M, Chauveau E, Doceul V, Marianneau P, Eléouët J-F, Delmas B, Sailleau C. Schmallenberg virus in France. 6<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE « Schmallenberg virus », Brighton (Grande-Bretagne), 15 juin 2012.

✓ Zientara S\*, Sailleau C, Viarouge C, Riou M, Moreau J, Martin G, Comtet L, Desprat A, Pourquier P, Schwarz P, **Vitour D**, Bréard E. Experimental infection of cattle with Epizootic Haemorrhagic Disease virus serotype 6 strain from La Reunion Island. World Buiatrics Congress, Lisbonne (Portugal), 3-6 juin 2012.

✓ Zientara S\*, Languille J, Pelzer S, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, **Vitour D**, Dominguez M, Bréard E. Nouvelle émergence dans le nord de l'Europe : le virus Schmallenberg. Journées de l'AEEMA, Maisons-Alfort (France), 30 mai-1<sup>er</sup> juin 2012.

✓ Zientara S\*, Languille J, Pelzer S, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, **Vitour D**, Dominguez M, Bréard E. Un virus émergent dans le nord de l'Europe : le virus Schmallenberg. 14<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris (France), 29-30 mars 2012.

## 2011

---

✓ Lara E\*, Chauveau E, Doceul V, Adam M, Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Desprat A, Zientara S, **Vitour D**. NS3 of Bluetongue virus interferes with the innate antiviral response.

Annual Meeting of the French Society for Immunology, Montpellier (France), 8-10 novembre 2011.

✓ Chauveau E\*, Lara E, Adam M, Sailleau C, Breard E, Zientara S, **Vitour D**. NS3 of Bluetongue virus interferes with the innate antiviral response. 9<sup>th</sup> Joint Meeting of ICS-ISICR Cytokines and Interferons, Florence (Italie), 9-12 octobre 2011.

✓ Chauveau E\*, Ruscanu S\*, **Vitour D**, Schwartz-Cornil I. Réponse immunitaire innée des cellules dendritiques et non hématopoïétiques au virus de la fièvre catarrhale ovine. Journées d'animation scientifique du département Santé animale de l'INRA, Fréjus (France), 22-25 mai 2011.

✓ Chauveau E, Adam M, Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Zientara S, **Vitour D\***. Rôle de la protéine NS3 du virus de la FCO dans l'immunité innée antivirale. 8<sup>èmes</sup> Journées Immunologie des animaux domestiques (IAD), Marcy l'Etoile (France), 5-6 mai 2011.

✓ Chauveau E\*, Adam M, Sailleau C, Bréard E, Zientara S, **Vitour D**. Interaction of Bluetongue virus with the innate antiviral response. 5th Annual Meeting EPIZONE, Arnhem (Pays-Bas), 11-13 avril 2011.

## 2010

---

✓ Chauveau E\*, Adam M, Sailleau C, Bréard E, Desprat A, Viarouge C, Zientara S, **Vitour D**. Rôle de la protéine NS3 du virus de la FCO dans l'immunité innée antivirale. Journée des Doctorants de l'ENVA, Maisons-Alfort (France), 22 octobre 2010.

✓ **Vitour D\***, Guillotin J, Sailleau C, Viarouge C, Desprat A, Wolff F, Belbis, Durand B, Bréard E, Zientara S, Zanella G. Interférence des anticorps colostraux avec la réponse à la vaccination contre le serotype 8 du virus de la fièvre catarrhale ovine ou Bluetongue (BTV-8) chez des veaux nés de mères vaccines par un vaccin inactif anti-BTV-8. Journées de l'AEEMA, Maisons-Alfort (France), 20-21 mai 2010.

## 2009

---

✓ **Vitour D\***, Sailleau C, Bréard E, Zientara S. Identification and characterization of Orbivirus isolates from La Réunion and Martinique Islands. Medreonet Meeting, Lisbonne (Portugal), 2-4 décembre 2009.

## 2005

---

✓ Becker M\*, **Vitour D**, Poncet D. RoXaN, a cellular protein capable of interacting with rotavirus NSP3, forms punctuate nuclear and cytoplasmic structures. 2<sup>nd</sup> Annual Meeting American Society for Virology, Pennsylvanie (Etats-Unis), 2005.

2003

---

✓ **Vitour D\***, Poncet D. RoXaN, a new cellular partner for rotavirus NSP3 and PABP. 8<sup>th</sup> International Symposium on Double stranded RNA viruses, Castelvecchio Pascoli (Italie), 2003.

## 5.5 Brevets-valorisation

**2007** Brevet européen n°06291358-1223: “Use of modulating agent that interacts with the pbd of plk proteins for modulating IFN induction”.

## 6. Encadrement scientifique

### Thèses d’université

---

✓ **Kundlacz Cindy**. Cartographie des interactions entre protéines du virus de la fièvre catarrhale ovine et protéines cellulaires chez son hôte mammifère et son hôte vecteur. Université Paris-Est. Thèse soutenue le 18 décembre 2018.

✓ **Gouzil Julie**. Etude du facteur de virulence NSs du virus Schmallenberg. Université Paris-Est. Thèse soutenue le 27 janvier 2016.

✓ **Chauveau Emilie**. Etude des mécanismes d’induction et de contrôle de la production d’interféron par le BTV dans les cellules non-hématopoïétiques. Université Paris-Diderot – Paris 7. Thèse soutenue le 22 novembre 2012.

### Doctorats vétérinaires

---

✓ **Martinez Colas**. Etude bibliographique des facteurs intracellulaires impliqués dans la restriction d’hôtes lors d’infections virales. Faculté de Médecine de Créteil, Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort. Thèse soutenue le 12 janvier 2017.

✓ **Poiret Emilie**. Analyse bibliographique du rôle des interactions moléculaires dans l’échappement des virus à la voie interféron. Faculté de Médecine de Créteil, Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort. Thèse soutenue le 10 janvier 2017.

### Licences-Masters

---

✓ **Morin Margot**. Pathogenèse et transmission du virus de la fièvre catarrhale ovine : rôle de la protéine NS3. Master 2 (A2I) : Agents infectieux – Interactions avec leurs hôtes et l’environnement, Université Paris Saclay/Versailles Saint Quentin-en-Yvelines. Stage réalisé de janvier à juin 2018.

✓ **Morin Margot**. Détermination des interactions protéiques entre le virus de la FCO et son hôte. Master 1 Immunologie, Microbiologie, Infectiologie, Virologie, Université Paris-Diderot – Paris 7. Stage réalisé de juin à juillet 2017.

✓ **Gouel Claire.** Identification des interactions entre protéines virales et cellulaires par la technique du double-hybride en levure. Licence Sciences du vivant, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6. Stage réalisé de juin à juillet 2016.

✓ **Kundlacz Cindy.** Etude de la réponse immunitaire innée et des interactions moléculaires virus-hôte pour le virus de la fièvre catarrhale ovine. Master 2 Biologie des Micro-organismes parcours Virologie, Université de Strasbourg. Stage réalisé de janvier à juin 2015.

✓ **Mantecon Matthieu.** La fièvre catarrhale ovine ou Bluetongue – Mise en place d'un outil de génétique inverse pour la FCO. Licence de Sciences de la Vie et de la Terre, Université Paris-Est. Stage réalisé d'avril à mai 2011.

✓ **Guehennec Jérémy.** Etude de l'expression des protéines du virus de la fièvre catarrhale ovine par le clonage des ORFs viraux par Gateway. Licence de Sciences de la Vie et de la Terre, Université Paris-Est. Stage réalisé d'avril à mai 2010.

### Stages divers

---

✓ **Tenaud Charline.** 3<sup>ème</sup> année formation vétérinaire. Stage d'observation de 3 semaines réalisé en juillet 2018.

✓ **Amaral da Silva Moraes Rayane.** Clonage des gènes de la voie des interférons de type 1 bovins par la technologie Gateway. DUT Génie Biologique, Université Paris 13. Stage réalisé de février à avril 2017.

✓ **Richard Océanne.** Interactions moléculaires du virus de la fièvre catarrhale ovine avec la cellule hôte. DUT Génie Biologique, Normandie Université. Stage réalisé d'avril à juin 2017.

✓ **Roux Céline.** Elaboration d'outils moléculaires pour l'analyse des fonctions protéiques des virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) et du virus Schmallenberg (SBV). DUT Génie Biologique, Université de Cergy-Pontoise. Stage réalisé d'avril à juin 2015.

## 7. Expertises scientifiques

✓ Membre élu du Conseil scientifique de l'Ecole vétérinaire d'Alfort de 2010 à 2014.

✓ Evaluator de projets de recherche : Anses, INRA, FINOVI, FNRS, ABIES, Israel Science Foundation (ISF), Institut Pasteur.

✓ Membre de jurys de diplômes universitaires : thèses d'université (Najate Ftaich - Lyon ; Sarita Yadav - Glasgow), EPHE (Céline Urien).

✓ Relecteur d'articles pour différents journaux scientifiques : J. Virol., Vaccine, Virology journal, J. Med. Vet. Science, Plos One, Cellular and Molecular Life Sciences, Vet. Microbiol, Epidemiol and Infection, Intervirology, YMPAT, Viruses, Vet. Research.

### Comités de thèse

---

✓ **Joëlle Mettier.** Caractérisation moléculaire des mécanismes de franchissement de barrières d'espèces aviaires/mammifères des virus influenza A. Soutenance de thèse prévue fin 2020.

✓ **Giulia Gallo.** Etude d'interactions d'hantavirus avec leur hôte humain ou rongeur en condition de persistance ou de pathogénicité. Soutenance de thèse prévue fin 2019.

✓ **Marie Pourcelot**. Implication des endomembranes et de l'ubiquitination dans l'activation d'IRF3 après détection des ARNs viraux. Université Paris Saclay. Thèse soutenue le 21 septembre 2016.

✓ **Ibrahim Youssef**. Contribution à la mise en place d'un système de génétique inverse pour le virus de la paralysie chronique de l'abeille. Université Aix Marseille. Thèse soutenue le 15 septembre 2016.

✓ **Lela Kopliku**. Etude des déterminants de la persistance du virus de la fièvre aphteuse. Université Pierre et Marie Curie – Paris 6. Thèse soutenue en 2014.

✓ **Jérôme Bouquet**. Génomique d'un virus zoonotique à ARN : le cas particulier du virus de l'hépatite E. Université Pierre et Marie Curie – Paris 6. Thèse soutenue le 27 septembre 2012.

✓ **Suzana Ruscanu**. Interactions entre le virus bluetongue et les cellules dendritiques conventionnelles et plasmacytoïdes. Université de Versailles Saint-Quantin-en-Yvelines. Thèse soutenue le 25 septembre 2012.

## 8. Enseignement

- 2016 (1 semaine)*      **Organisation de travaux pratiques pour des étudiants du 4th One Health Course – Antigone** (Institut Pasteur – Anses).
- 2010*                      **Cours pour l'Ecole doctorale B2T**. Virus et immunité innée. Hôpital Saint Louis (Paris), 14 juin 2010.
- 2005-6*                    **Encadrant de séminaires thématiques pour des étudiants de Master 2** (Cours de Virologie Fondamentale de l'Institut Pasteur)

## 9. Contrats de recherche

- 2017-2019*              **DIM One Health (Région Ile-de-France)**. Cartographie comparée des interactions moléculaires virus-hôtes comme outil d'identification de mécanismes d'échappement viral impliqués dans le franchissement de barrière d'espèces. Coordinateur : Damien Vitour (Anses). Investissement Masterclave 22K€.
- 2017-2019*              **DIM One Health (Région Ile-de-France)**. Identification of Novel Target Sites for Therapeutic and Preventive Strategies against Orthobunyaviral Infection. Coordinateur : Félix Rey (Institut Pasteur). Post-doctorat 24 mois basé à l'Institut Pasteur (Jan Hellert).
- 2017-2019*              **Mitomort (ANR)**. Novel human pro-apoptotic transmembrane proteins targeting the mitochondrial network. Coordinateur : Simon Wain-Hobson (Institut Pasteur). Réalisation de cribles double-hybride 30K€.
- 2017-2020*              **PALE-Blu (EU)**. Understanding pathogen, livestock, environment interactions involving bluetongue virus (PALE-Blu). Coordinateur : Peter Mertens (University of Nottingham, UK).

2014-2019	<b>Création « groupe à 5 ans » (I5), Labex IBEID (ANR – Institut Pasteur – Anses - ENVA).</b> Antiviral response, pathogenesis and interspecies transmission of Bluetongue virus. Coordinateur : Damien Vitour (Anses).
2012-2015	<b>Financement doctoral (Anses).</b> Développement d'un vaccin déléte contre le virus Schmallenberg. Directeur : Stéphan Zientara ; Encadrant : Damien Vitour. Doctorat d'Université 3 ans basé à Maisons-Alfort (Julie Gouzil).
2012-2014	<b>Programme transversal de recherche (Anses-Institut Pasteur).</b>
2011-2012	<b>Financement post-doctoral (Anses).</b> Rôle de la protéine NS3 du virus de la FCO (BTV) dans la physiopathologie de l'infection. Coordinateur : Damien Vitour. Post-doctorat de 18 mois basé à Maisons-Alfort (Estelle Lara).
2010-2013	<b>EMIDA OrbiNet (EU).</b> Molecular and reverse genetics studies of orbivirus transmission, host responses, epidemiology and diagnostic systems. Coordinateur : Peter Mertens (The Pirbright Institute, UK). Post-doctorat 2 ans à Maisons-Alfort (Virginie Doceul).

## Evolution scientifique

### 1. Parcours scientifique – Contexte de la recherche

Depuis la fin des années 1990, j'ai été impliqué dans de multiples projets de recherche en virologie au travers de thématiques variées touchant à la virologie clinique, le diagnostic des infections virales, les interactions virus-hôtes et l'immunité innée antivirale. Mes activités de recherche concernaient des pathogènes majeurs en santé humaine ou vétérinaire (VIH, VHC, grippe, BTV, SBV, rotavirus). Au cours de mon DEA (2000-2001) puis de ma thèse (2001-2004), effectués au sein de l'INRA (Jouy-en-Josas) et du CNRS (Gif-s-Yvette) sous la direction de Didier Poncet, je me suis intéressé aux relations moléculaires entre le rotavirus bovin et son hôte cellulaire en caractérisant notamment une interaction entre la protéine virale NSP3 et RoXaN, une protéine cellulaire jusqu'alors non décrite. Par la suite, j'ai effectué un stage post-doctoral à l'Institut Pasteur sous la direction d'Eliane Meurs puis Moustapha Si-Tahar où j'ai étudié la réponse innée antivirale vis à vis du VHC et du virus influenza et contribué à élucider des nouveaux mécanismes liés à la modulation de la production des IFN- $\alpha/\beta$ . Une partie de ce travail a en outre fait l'objet d'un dépôt

de brevet. En 2009, j'ai intégré l'UMR1161 de Virologie dirigée par Stéphane Zientara (Laboratoire de Santé animale de Maisons-Alfort) en tant que chef de projet scientifique Anses dans l'équipe EVIR (Emergences virales des ruminants) dirigée par Stéphane Zientara. Depuis mon arrivée, j'ai développé des nouvelles thématiques de recherche autour de l'immunité innée et des interactions virus-hôtes en utilisant principalement le BTV comme modèle d'étude. Suite à l'émergence du SBV en Europe fin 2011, nous avons engagé des projets sur ce virus et identifié notamment un mécanisme d'adressage au nucléole pour le facteur de virulence NSs. Enfin, depuis début 2014, j'anime à l'intérieur de l'équipe EVIR mon propre groupe de recherche (I5 : Immunité innée, interactomique et transmission interspécifique des infections virales) labellisé par le Labex IBEID, pour un mandat de 5 ans. L'ensemble de ces travaux est réalisé en étroite collaboration avec le Laboratoire de référence sur les orbivirus hébergé également par l'équipe EVIR.

Depuis mon arrivée à Maisons-Alfort, j'ai encadré trois thésardes (Emilie Chauveau, Julie Gouzil et Cindy Kundlacz) qui ont publié plusieurs articles dont 3 comme 1<sup>er</sup> auteur dans *Journal of Virology*. Emilie Chauveau a grandement contribué à l'élucidation des mécanismes d'induction et de contrôle de la synthèse des IFN- $\alpha/\beta$  au cours de l'infection par le BTV. Julie Gouzil a, quant à elle, caractérisé une nouvelle fonction nucléolaire pour la protéine NSs du SBV. Cindy Kundlacz qui a soutenu récemment sa thèse (18 décembre 2018) a travaillé sur la modulation de la voie MAPK/ERK par le BTV et la cartographie des interactions BTV-hôtes par la méthode du double-hybride en levure. J'ai par ailleurs encadré 3 post-doctorants (Estelle Lara, Virginie Doceul, Grégory Caignard) et encadre actuellement Marie Pourcelot pour un stage post-doctoral. L'équipe I5 que j'anime comprend les personnes suivantes : Aurore Fablet (technicienne de recherche Anses, CDI), Grégory Caignard (IR INRA, CDI), Marie Pourcelot (post-doctorante), Rayane Amaral (assistante ingénieur ENVA, CDD).

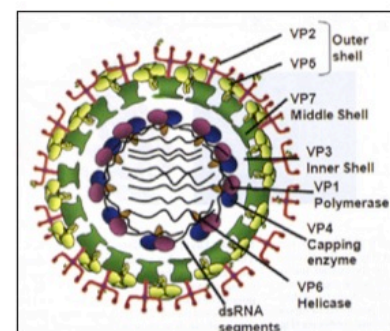
Depuis mon recrutement au sein de l'Anses en 2009, j'ai été impliqué dans 37 publications internationales d'articles ou de revues. J'ai participé à des projets européens (EMIDA Orbinet, PALE-BLUE) et ai coordonné des projets en lien avec l'Institut Pasteur (Programme transversal de recherche sur le SBV et les virus apparentés ; Labex IBEID « Emergency actions » sur la ré-émergence du BTV8 en 2015 et l'émergence du BTV4 en Corse et en France continentale en 2016-2017). J'ai également été à l'initiative de la mise en place d'un atelier d'Interactomique en Santé Animale, animé par Grégory Caignard (IR INRA), qui a généré un grand nombre de collaborations au sein du campus d'Alfort et également avec d'autres laboratoires académiques français.

## 2. Thématiques/travaux de recherche

Avec l'introduction du BTV8 en 2006 et du SBV en 2011, le nord de l'Europe a connu l'émergence inédite et subite de deux maladies virales épizootiques majeures en santé animale. Bien qu'ils appartiennent à des familles virales distinctes, ces deux virus sont tous les deux des arbovirus à génome segmenté qui sont transmis à des ruminants domestiques et sauvages par morsures de moucheron hémaphages appartenant au genre *Culicoides*. Certains virus apparentés au BTV (EHDV, AHSV) ou au SBV (SHAV, AKAV) avec lesquels ils partagent de nombreuses propriétés physiopathologiques sont également des pathogènes importants en santé animale. Une meilleure compréhension de la pathogenèse et des modes de transmission de ces arboviroses s'avère donc essentielle pour développer des méthodes de lutte plus efficaces.

### 2.1. Le virus de la FCO (Bluetongue virus, BTV)

Le virus de la FCO (en anglais Bluetongue virus, BTV) est l'agent étiologique de la FCO, une maladie non contagieuse qui affecte les ruminants domestiques et sauvages. La FCO est une arbovirose transmise par des moucheron femelles hémaphages appartenant au genre *Culicoides* (Mellor et al., 2000; Schwartz-Cornil et al., 2008; Tabachnick, 2004). Le BTV appartient au genre *Orbivirus* au sein de la famille des *Reoviridae*. Comme d'autres membres de ce genre viral, tels que les virus de la peste équine (African horse sickness virus, AHSV), de la maladie épizootique hémorragique (Epizootic haemorrhagic disease virus, EHDV) et de l'encéphalose équine (Equine encephalosis virus, EEV), le BTV fait partie de la liste des maladies à déclaration obligatoire auprès de l'Office international des épizooties (OIE). Le BTV partage des similarités antigéniques, structurales et moléculaires avec les autres membres du genre *Orbivirus*. C'est un virus non-enveloppé avec une particule virale organisée en une capsid à double-couche concentrique (**Figure 1**). Le génome viral, composé de dix segments d'ARNdb, code pour sept protéines structurales (VP1-7) et six protéines non structurales (NS1-NS5, NS3A) (Belhouchet et al., 2011; Ratnien et al., 2011; Roy, 2005; Stewart et al., 2015). Sur la



**Figure 1.** Schéma d'une particule de BTV (from P. Roy; Fields 6<sup>th</sup> Edition, p1402-23).



base de la variabilité de la protéine de surface VP2, on dénombre actuellement 27 sérotypes de BTV à travers le monde (BTV1-27) avec une faible protection croisée entre les sérotypes (Belbis et al., 2017; Maan et al., 2011; Schwartz-Cornil et al., 2008; Zientara et al., 2014).

La FCO est enzootique dans de nombreuses régions du monde mais était absente d'Europe jusqu'à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle hormis quelques rares incursions (Maclachlan, 2011; Walton, 2004). Depuis 1998, plusieurs sérotypes de BTV (BTV1, 2, 4, 9, 16, 27) ont émergé dans le bassin méditerranéen et de façon plus surprenante dans le nord de l'Europe (BTV6, 8, 11, 25) (Maclachlan, 2011; Purse et al., 2005). En France, la Corse a été particulièrement impactée avec la détection du BTV2 en 2000, du BTV4 en 2003, du BTV16 en 2004 (Bréard et al., 2004; Zientara and Sanchez-Vizcaino, 2013) et plus récemment des BTV1 et 27 (voir ci-après).

En 2006, une souche de sérotype 8 émergea de façon totalement inattendue en Belgique et aux Pays-Bas et se propagea dans les deux années suivantes à une grande partie de l'Europe, provoquant d'importantes pertes économiques liées essentiellement à des surcoûts indirects (campagnes de vaccination, surveillance, restrictions des mouvements d'animaux) (Saegerman et al., 2008; Schwartz-Cornil et al., 2008). Cette souche de BTV8 présentait des propriétés inattendues incluant une capacité accrue à provoquer des signes cliniques modérés à sévères chez les bovins qui développent habituellement peu ou pas de symptômes (Elbers et al., 2008; Schwartz-Cornil et al., 2008). En 2012, la France continentale, comme de nombreux autres pays européens recouvrait son statut indemne de FCO. Cependant, une souche de BTV1 provenant de Sardaigne était détectée en Corse en septembre 2013 (Sailleau et al., 2014). En 2014, une enquête menée sur des chèvres en Corse a permis de mettre en évidence un nouveau sérotype de BTV : le BTV27. De façon inédite, ce virus se caractérise par un tropisme d'hôtes restreint à l'espèce caprine et une absence de signes cliniques chez les animaux infectés. De plus, la transmission de ce virus s'effectuerait indépendamment du vecteur culicoïde, probablement par contact direct entre animaux (Belbis et al., 2017; Bréard et al., 2018a; Zientara et al., 2014). A la fin août 2015, le BTV8 était de nouveau détecté dans le département de l'Allier sur un bouc présentant quelques signes cliniques évocateurs de l'infection par le BTV (Bréard et al., 2016; Sailleau et al., 2017a). Le virus s'est depuis propagé dans une grande partie de la France et continue de circuler activement aujourd'hui (Courtejoie et al., 2018a, 2018b, 2018c). Enfin, à la fin de l'année 2016, un virus correspondant au sérotype 4 fut identifié à partir de prélèvements issus de moutons malades dans le sud de la Corse. Quelques

mois plus tard, ce BTV4 était détecté en région Rhône-Alpes et continue de se disséminer depuis à d'autres régions françaises (Sailleau et al., 2018).

Le BTV infecte un large spectre d'hôtes ruminants domestiques et sauvages et induit des signes cliniques variables dont la sévérité dépend de multiples facteurs, tels que l'espèce infectée ou la virulence de la souche de BTV. Ainsi, l'espèce ovine apparaît plus sensible que les bovins et les races européennes sont généralement plus affectées que leurs homologues africaines (Maclachlan et al., 2009). Cependant, comme mentionné précédemment, la souche de BTV8 introduite en Europe du Nord en 2006 induisait des symptômes chez les bovins (Elbers et al., 2008; Maclachlan et al., 2009; Schwartz-Cornil et al., 2008). Les signes cliniques provoqués par la FCO sont souvent assez frustes mais incluent dans les formes les plus sévères des hémorragies et des ulcères de la cavité buccale et du tractus gastrointestinal supérieur, une nécrose des muscles cardiaque et squelettique, un œdème des poumons (Maclachlan et al., 2009). Il est admis que les symptômes cliniques de l'infection par le BTV résultent d'une combinaison de phénomènes pathologiques incluant une atteinte vasculaire induite par le virus, une réponse inflammatoire endothéliale (DeMaula et al., 2001, 2002), l'apoptose des cellules infectées (Umeshappa et al., 2010). Les déterminants de la virulence du BTV restent toutefois peu connus mais des données récentes incriminent la protéine NS3 comme facteur de virulence (voir ci-après).

### **2.1.1. Réponse innée anti-BTV**

La réponse immune antivirale est la première ligne de défense contre les virus, avec pour événement central la production des IFN de type I (IFN- $\alpha/\beta$ ) et d'autres cytokines pro-inflammatoires qui vont contrôler l'infection (Randall and Goodbourn, 2008). La liaison de ces cytokines à leurs récepteurs entraîne une cascade de signalisation responsable de l'induction de l'expression de gènes dont les produits présentent une activité antivirale. L'activation de ces voies de signalisation permet à l'organisme infecté d'établir un état antiviral dans les cellules infectées et les cellules adjacentes via un mécanisme autocrine et paracrine. Cette activation est également impliquée dans la régulation de la réponse immune adaptative générée par les lymphocytes B et T (Huber and Farrar, 2011; Mattei et al., 2010). De manière globale, l'immunité innée peut ainsi gouverner l'intensité de la pathogenèse virale.

### 2.1.1.1. Induction de la synthèse d'IFN- $\alpha/\beta$ par le BTV

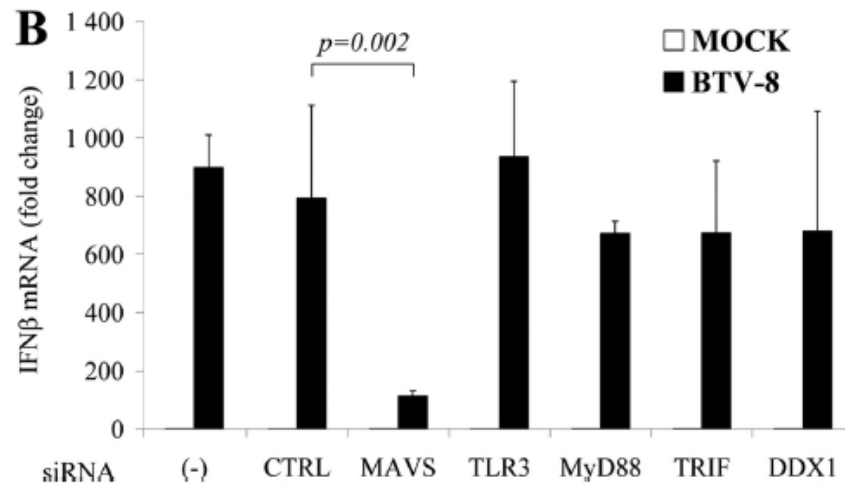
Les réponses cellulaires innées sont activées en réponse à la reconnaissance de motifs moléculaires microbiens (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) par des récepteurs cellulaires spécifiques (pattern recognition receptors, PRRs). Pour les virus à ARN, les ARNdb et sb génomiques ou générés au cours de la réplication virale constituent deux PAMPs majeurs. Ils sont détectés par des récepteurs de type Toll (Toll-like receptors, TLR) et des récepteurs TLR-indépendants, dont des membres de la famille des récepteurs de type RIG-I (RIG-I-like receptor, RLR) (Lässig and Hopfner, 2017). Pour la famille des *Reoviridae*, plusieurs PRRs ont été identifiés comme jouant un rôle dans la synthèse d'IFN- $\alpha/\beta$ , incluant TLR3 (Alexopoulou et al., 2001), RIG-I et MDA5 (Broquet et al., 2011), PKR (Sen et al., 2011) et des hélicases dépendant de la voie TRIF (Zhang et al., 2011). L'activation de ces PRRs déclenche une cascade de signalisation conduisant au recrutement de protéines adaptatrices, telles que MAVS ou TRIF, qui activent à leur tour les protéines kinases dépendant de la voie IRF3 (TBK1/IKK $\epsilon$ ) ou NF- $\kappa$ B (NEMO/IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ ) nécessaires à la production d'IFN- $\alpha/\beta$ . La fixation de ces cytokines sur leur récepteur IFNAR va activer une seconde cascade de signalisation, dite voie JAK/STAT, qui met en jeu les kinases Jak1/Tyk2 capables d'activer les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 lesquels, en association avec IRF9, vont être transloqués dans le noyau pour activer la synthèse de plusieurs centaines de gènes (ISGs) à action antivirale ou immunomodulatrice (Vitour et al., 2014).

Depuis de nombreuses années, le BTV est reconnu comme un puissant inducteur de la production d'IFN- $\alpha/\beta$  dans de multiples modèles *in vivo* et *in vitro* provenant de différents tissus et espèces (mouton, vache, souris, homme) (Foster et al., 1991; Fulton and Pearson, 1982; Hemati et al., 2009; Huismans, 1969; Jameson and Grossberg, 1979; Jameson et al., 1978; MacLachlan and Thompson, 1985). Alors que la plupart des sérotypes de BTV semblent capables d'induire la production d'IFN- $\alpha/\beta$ , plusieurs travaux dont une partie menée dans notre laboratoire ont montré d'importantes variations entre les souches de BTV (Chauveau et al., 2012; Fulton and Pearson, 1982; Lyons et al., 1982). Nous avons en outre confirmé que l'infection par le BTV conduisait à une forte production d'IFN dans de multiples modèles cellulaires et montré que les ARN hélicases RIG-I et MDA5 jouaient un rôle crucial pour l'activation du facteur de transcription IRF-3 et de manière conséquente la synthèse d'IFN- $\alpha/\beta$  (Chauveau et al., 2012). Nos données suggèrent que la voie RLR/MAVS est impliquée dans le contrôle de la réponse antivirale et inflammatoire vis à vis du BTV dans des cellules cibles non-hématopoïétiques (**Figures 2 et 3**) (Chauveau et al., 2012). Nous étions également partie

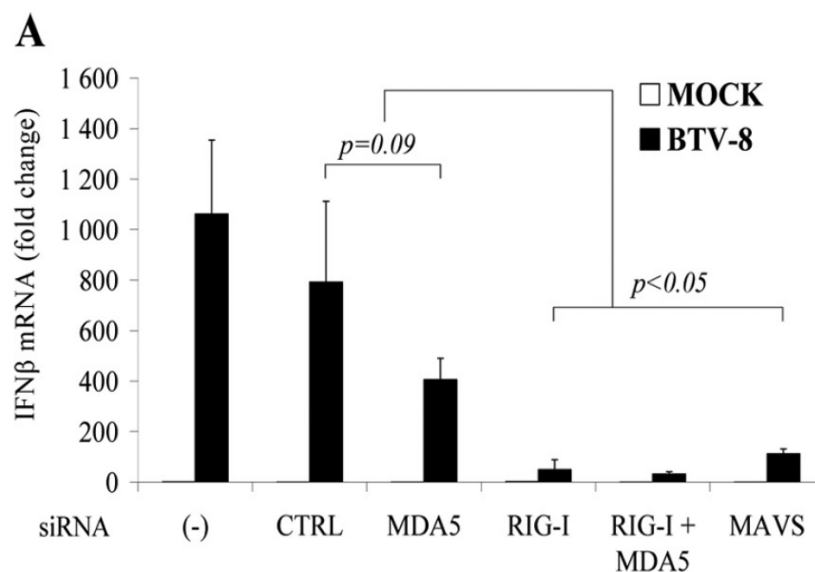
prenante d'une étude réalisée par le groupe d'Isabelle Schwartz (INRA, Jouy-en-Josas) qui démontra que, dans les cellules dendritiques, le BTV induit la production d'IFN- $\alpha/\beta$  par une voie dépendante de la protéine adaptatrice Myd88 mais indépendante de la voie des TLR7/8 (Ruscanu et al., 2012).

#### **2.1.1.2. Régulation de la voie des IFN- $\alpha/\beta$ par le BTV**

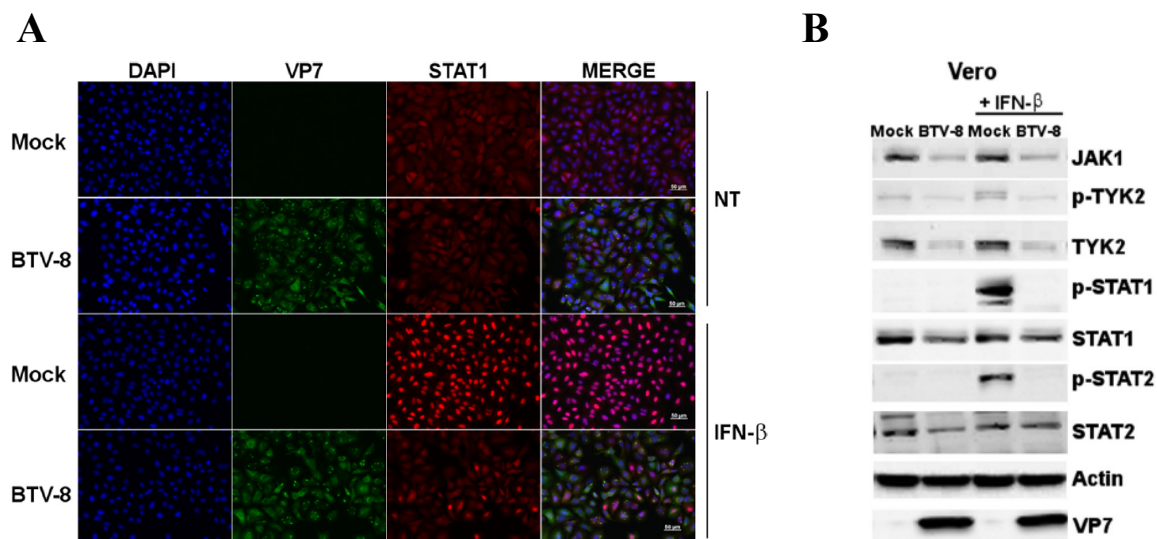
La voie des IFN de type I constituant une puissante réponse antivirale, la plupart des virus ont développé des stratégies élaborées pour contourner cet effet. En recherchant de tels mécanismes pour le BTV, nous avons observé notamment que la protéine NS3 bloquait très efficacement l'activation du promoteur IFN- $\beta$  (voir plus bas). Par ailleurs, nous nous sommes également intéressés à l'impact du BTV sur la voie de réponse aux IFN- $\alpha/\beta$  et plus particulièrement sur la voie de signalisation Jak/STAT. Dans des cellules infectées par le BTV, l'activation du promoteur ISRE et l'expression d'ISGs se trouvent inhibées (Doceul et al., 2014). Nous avons pu montrer que cette inhibition faisait intervenir deux mécanismes différents en fonction du cycle viral (**Figure 4**). Ainsi, le BTV interviendrait d'une part, en inhibant la translocation nucléaire du facteur de transcription STAT1 et d'autre part en induisant la dégradation des protéines kinases Jak1 et Tyk2 à des temps plus tardifs de l'infection (Doceul et al., 2014). Les mécanismes moléculaires sous-jacents restent toutefois à déterminer.



**Figure 2. Le BTV induit la synthèse d'IFN-β par une voie dépendante de MAVS.** Des cellules A549 ont été transfectées ou non (-) avec des petits ARN interférents (siRNA) spécifiques de MAVS, TLR3, MyD88, TRIF ou DDX1 ou des siRNA contrôles (CTRL). Après 48h de transfection, les cellules ont été infectées ou non (MOCK) avec du BTV8 (0,1 TCID<sub>50</sub>/cellule). Après 24h d'infection, les ARN totaux ont été extraits et l'expression de l'ARNm de l'IFN-β a été déterminée par RT-PCR quantitative (adapté de Chauveau et al. 2012).



**Figure 3. Implication des ARN hélicases RIG-I et MDA5 dans l'induction d'IFN-β par le BTV.** Des cellules A549 ont été transfectées ou non (-) avec des petits ARN interférents (siRNA) spécifiques de RIG-I ou MDA5 ou des siRNA contrôles (CTRL). Après 48h de transfection, les cellules ont été infectées ou non (MOCK) avec du BTV8 (0,1 TCID<sub>50</sub>/cellule). Après 24h d'infection, les ARN totaux ont été extraits et l'expression de l'ARNm de l'IFN-β a été déterminée par RT-PCR quantitative (adapté de Chauveau et al. 2012).



**Figure 4. Le BTV inhibe la voie de réponse de l'IFN en bloquant la translocation de STAT1 (A) et en induisant la dégradation de Jak1 et Tyk2 (B).** **A.** Des cellules A549 ont été infectées ou non (MOCK) avec du BTV8 (0,05 TCID<sub>50</sub>/cellule). Après 18h d'infection, les cellules ont été traitées ou non (NT) avec de l'IFN-β (1000 UI/ml) pendant 30min. Les cellules ont ensuite été utilisées pour des expériences d'immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques ciblant VP7 (vert) et STAT1 (rouge), le noyau étant marqué au DAPI (bleu). Echelle: 50μm. **B.** Des cellules Vero ont été infectées ou non (MOCK) avec du BTV8 (0,05 TCID<sub>50</sub>/cellule). Après 42h d'infection, les cellules ont été traitées ou non (NT) avec de l'IFN-β (1000 UI/ml) pendant 15min. Les lysats cellulaires ont ensuite été utilisés pour des expériences de Western blot afin de mesurer l'expression de JAK1, p-TYK2, TYK2, p-STAT1, STAT1, p-STAT2, STAT2, VP7 et l'actine (adapté de Doceul et al. 2014).

A noter enfin qu'une nouvelle protéine de BTV identifiée en 2011, la protéine NS4, semble également capable de contrer la réponse innée antivirale (Ratinier et al., 2016). En effet, la réplication d'un virus recombinant n'exprimant plus NS4 se trouve fortement inhibée dans des cellules traitées préalablement à l'IFN au contraire de la forme sauvage.

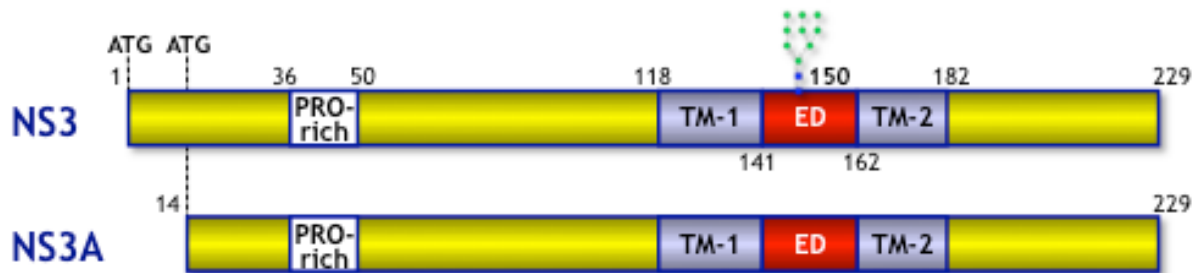
### **2.1.2. NS3 de BTV : une protéine multifonctionnelle**

NS3 et NS3A sont des protéines membranaires, NS3A possédant 13 acides aminés de moins en N-terminal (N-ter). NS3 est localisée à la membrane plasmique, au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi (Beaton et al., 2002; Han and Harty, 2004; Hyatt et al., 1991). Comme le montre la **figure 5**, ces protéines sont composées de deux domaines transmembranaires séparés par un court domaine extra-cellulaire et encadrés par un long domaine N-ter et un court domaine C-terminal (C-ter) cytoplasmiques (Bansal et al., 1998; Beaton et al., 2002; Wu et al., 1992). Un site de glycosylation se situe dans le domaine extra-cellulaire et un autre dans le domaine N-ter mais ils ne semblent pas être essentiels pour le fonctionnement de la protéine (Bansal et al., 1998; van Staden and Huismans, 1991). NS3A n'est pas indispensable à la réplication du virus dans les cellules de mammifères contrairement à NS3 (Celma and Roy, 2011). Ces deux protéines sont exprimées lors de l'infection mais ne font pas partie de la particule virale. Elles sont surexprimées dans les cellules d'insecte (Guirakhoo et al., 1995).

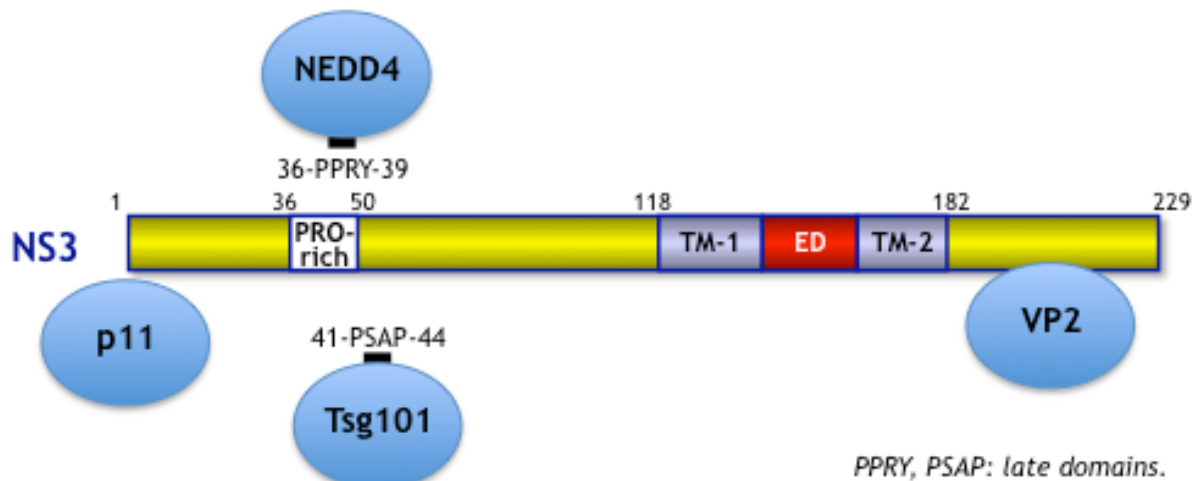
#### **2.1.2.1. NS3 favorise le relargage du BTV**

La protéine NS3 a un rôle dans le relargage des virions via plusieurs mécanismes. Il a été démontré par surexpression de la protéine dans des cellules simiennes COS-1 qu'elle s'oligomérisait pour former des pores dans la membrane plasmique (Han and Harty, 2004). Cette fonction s'apparente à celle d'une viroporine et faciliterait la sortie des virions par lyse, principalement dans les cellules de mammifère. Dans les cellules de culicoïdes infectées par le BTV, aucune lyse n'est en revanche observée, suggérant un autre mode de relargage du virus.

NS3 interagit via son domaine C-ter avec VP2 (**Figure 6**) (Wirblich et al., 2006). L'utilisation de mutants produits par génétique inverse a démontré que la liaison entre ces protéines n'est pas essentielle pour la réplication du virus ou la traduction des protéines virales mais elle est importante pour le relargage du virus (Bhattacharya et al., 2007).



**Figure 5. Représentation schématique des protéines NS3 et NS3A de BTV.** La protéine NS3A est codée sur le même ORF que NS3 à partir d'un second ATG et se trouve donc tronquée des 13<sup>ers</sup> aa. Les protéines NS3 et NS3A possèdent la un domaine riche en prolines (PRO-rich) en Nter et deux domaines transmembranaires (TM-1 et -2) en Cter qui encadrent un domaine extracellulaire (ED). Ce dernier comprend un site de glycosylation au niveau de l'Asn150.



**Figure 6. Partenaires cellulaires et viraux de NS3.** Cette figure présente les interactants protéiques décrits pour la protéine NS3 de BTV avec leurs domaines d'interaction respectifs.



En effet, VP2 étant associée aux filaments intermédiaires de vimentine, cette liaison est impliquée dans le trafic des virions à la membrane plasmique (Celma and Roy, 2009). NS3 serait également capable d'interagir avec VP5, l'autre protéine de surface du BTV (Bhattacharya and Roy, 2008).

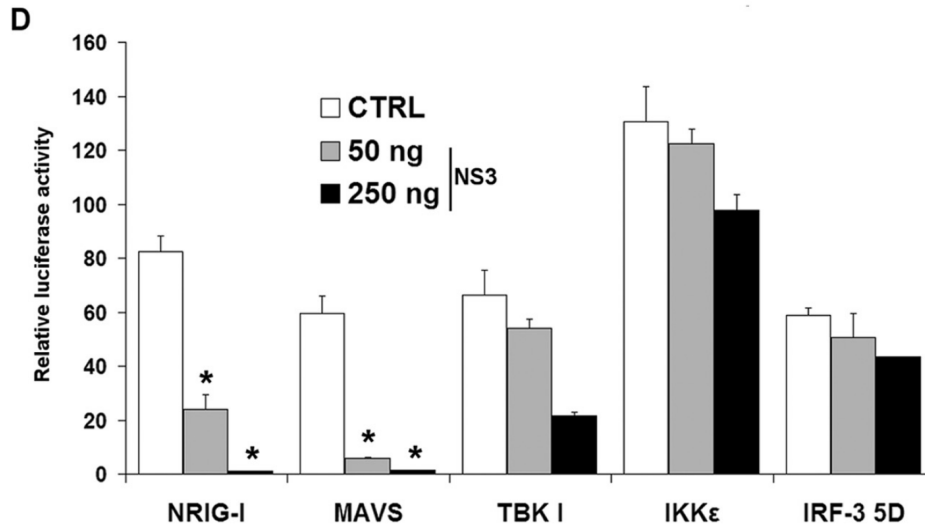
Par ailleurs, NS3 interagit avec la chaîne légère de la calpactine (S100A10/p11) (Beaton et al., 2002), impliquée dans l'exocytose, qui est nécessaire et suffisante pour assurer la présentation de protéines cellulaires à la membrane plasmique (Celma and Roy, 2011). Cette interaction semble jouer un rôle dans une phase tardive du cycle viral, son inhibition conduisant à l'assemblage de cores ou de particules incomplètes. De même, NS3 et NS3A interagissent avec la protéine ESCRT-I, Tsg101, qui est impliquée dans le trafic cellulaire et la libération de virus enveloppés (**Figure 6**) (Wirblich et al., 2006). Dans les cellules de drosophile, cette même interaction est conservée avec l'orthologue de Tsg101.

En conclusion, NS3 semble donc servir de plateforme pour le trafic et la libération des particules virales néoformées.

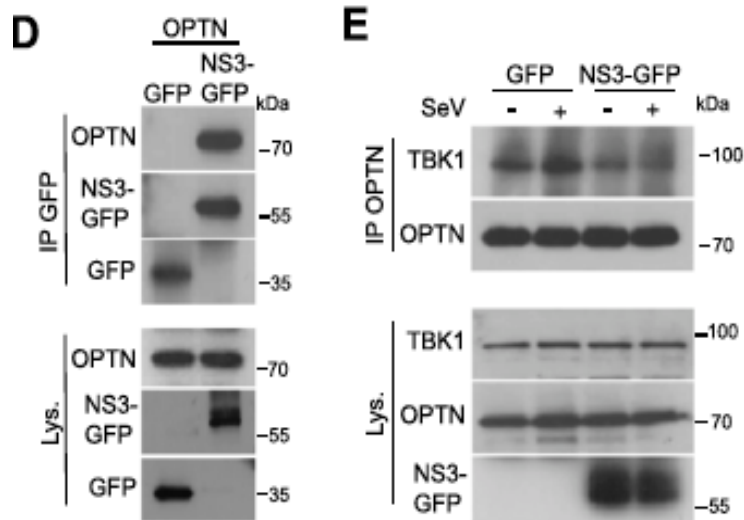
#### **2.1.2.2. NS3 inhibe la synthèse des IFN- $\alpha/\beta$**

Comme décrit précédemment, nous avons pu montrer que le BTV inhibe la voie de réponse des IFN- $\alpha/\beta$  en bloquant la translocation nucléaire de STAT1 et en dégradant les protéines Jak1/Tyk2 (Doceul et al., 2014). Nous avons également cherché à déterminer la capacité du BTV et des différentes protéines codées par le virus à interférer avec la voie de signalisation des RLRs qui induit la synthèse d'IFN-I.

En particulier, l'effet de chaque protéine de BTV-8 a été évalué sur l'activation du promoteur IFN- $\beta$  après stimulation par un domaine constitutivement actif de RIG-I dans des cellules humaines 293T. De façon intéressante, l'activation du promoteur IFN- $\beta$  était drastiquement affectée par la surexpression de la protéine NS3 (**Figure 7**) (Chauveau et al., 2013). Par la suite, nous avons pu observer que cette action apparaissait conservée parmi d'autres sérotypes de BTV. L'action de NS3 semble intervenir au niveau transcriptionnel et non traductionnel puisque NS3 ne modifie pas l'activité d'un ARNm codant pour la luciférase. Par ailleurs, en mesurant l'expression de multiples gènes cellulaires en présence de NS3, nous avons pu montrer que celle-ci bloquait spécifiquement l'expression de gènes liés à la voie IFN et écarter ainsi un effet global de NS3 sur la transcription des gènes cellulaires.



**Figure 7. Effet de NS3 sur l'activation du promoteur IFN- $\beta$ .** Des cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides rapporteurs pRSV- $\beta$ Gal (contrôle de transfection), pIFN $\beta$ -Luc (luciférase sous contrôle du promoteur IFN- $\beta$ ), ainsi qu'avec un plasmide contrôle (CTRL) ou un plasmide codant pour FLAG-NS3. Le promoteur IFN- $\beta$  a été activé par transfection d'un plasmide codant pour une forme constitutivement active de RIG-I, MAVS, TBK1, IKK $\epsilon$  et une forme constitutivement active de IRF3 (IRF3-5D). L'activité luciférase a été mesurée à partir des lysats cellulaires collectés 16h post-transfection. Adapté de Chauveau et al, 2013.



**Figure 8. La protéine NS3 de BTV interfère avec l'association OPTN-TBK1.** (D) Des cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour l'optineurine (OPTN) et un plasmide codant pour la GFP ou GFP-NS3. 16h après transfection, les cellules ont été lysées et les protéines précipitées (IP) avec un anticorps dirigé contre la GFP. (E) Des cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour la GFP ou GFP-NS3. 16h après transfection, les cellules ont été infectées ou non pendant 7h avec un virus Sendai. Les cellules ont ensuite été lysées et les protéines précipitées (IP) avec un anticorps dirigé contre l'OPTN. Les protéines ont été analysées par Western blot avec les anticorps spécifiés sur la figure. Adapté de Pourcelot et al, 2016.

Afin de vérifier que NS3 bloque l'activation du promoteur IFN- $\beta$  après activation de la voie des RLRs, plusieurs agonistes de cette voie ont été utilisés : virus Sendai, poly(I:C) et poly(dA:dT). NS3 est capable de bloquer l'activation du promoteur IFN- $\beta$  induit par ces trois stimuli, confirmant l'effet antagoniste de NS3 sur la voie des RLRs (Chauveau et al., 2013).

Afin de mieux comprendre à quel niveau intervient NS3 dans la voie des RLRs, nous avons surexprimé les protéines MAVS, TBK1, IKK $\epsilon$  et IRF3-5D (une forme constitutivement active d'IRF3) comme activateurs du promoteur IFN- $\beta$ . Alors que l'action de TBK1, IKK $\epsilon$  et IRF3-5D n'était pas ou peu affectée par NS3, ce dernier était en revanche capable de bloquer l'activation du promoteur IFN- $\beta$  médiée par MAVS (**Figure 7**). Ce résultat suggérait que NS3 interfère avec la voie de signalisation des RLRs en amont des kinases TBK1/IKK $\epsilon$  et au niveau ou en aval de MAVS.

Grâce à une collaboration avec le groupe de Damien Arnoult à Villejuif, il apparaît que NS3 agirait en empêchant le recrutement de TBK1 à l'optineurine (OPTN), un événement essentiel à l'activation de cette IRF3-kinase (**Figure 8**) (Pourcelot et al., 2016).

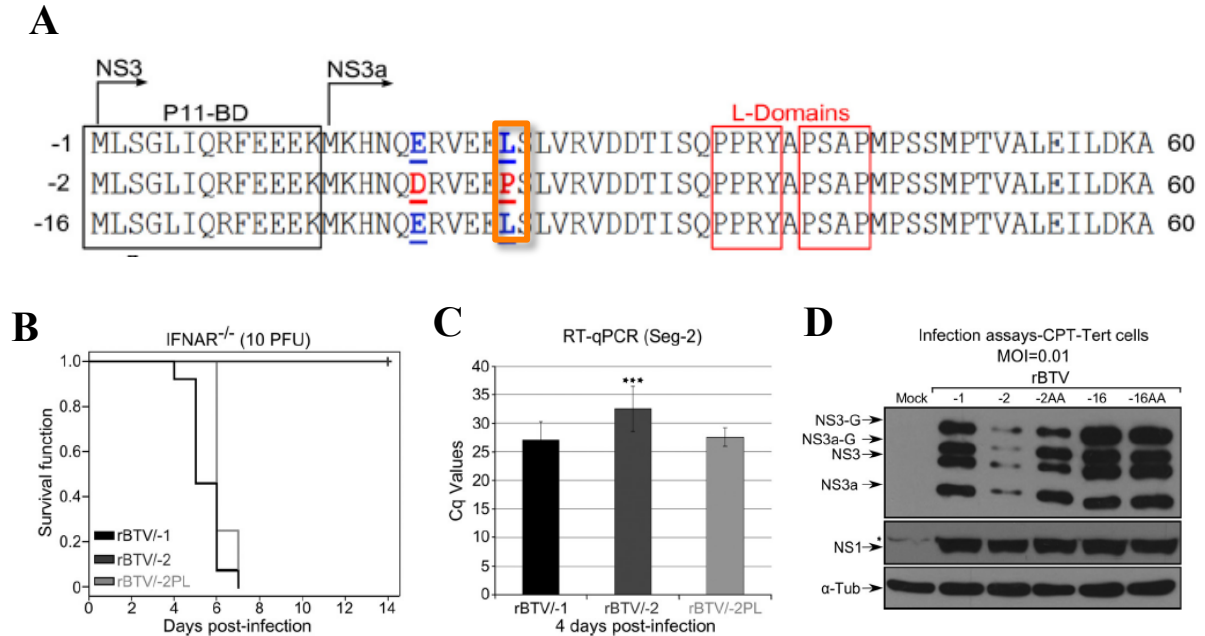
#### **2.1.2.3. NS3, un facteur de virulence essentiel du BTV**

Des travaux menés par le groupe de Massimo Palmarini (Glasgow) utilisant le système de génétique inverse pour générer des virus réassortants entre une souche de BTV8 virulente sauvage ou atténuée par passage en culture cellulaire ont permis de montrer que le segment 10 de BTV constituait un des déterminants de la virulence dans un modèle de souris IFNAR<sup>-/-</sup> (Janowicz et al., 2015). La même stratégie de réassortiments mais cette fois-ci entre une souche de BTV1 atténuée et une souche de BTV8 virulente implique les protéines VP2, VP5 et NS3 comme acteurs essentiels dans la pathogénicité du BTV chez le mouton (Celma et al., 2014).

L'emploi de virus recombinants codant pour des mutants de NS3 issus de différents topotypes a permis à l'équipe de Frédérick Arnaud (Lyon) de montrer l'importance de NS3 sur la cinétique de réplication en cellules de mammifère (Ftaich et al., 2015). De plus, la nature du résidu en position 24 suffit à modifier le turnover de la protéine dans des cellules ovines et à impacter sur la virulence du BTV dans un modèle de souris IFNAR<sup>-/-</sup> (**Figure 9**) (Ftaich et al., 2015).

#### **2.1.2.4. La protéine NS3 de BTV active la voie MAPK/ERK**

En 2010, Mortola et al. montrèrent une activation de la voie MAPK/ERK dans des cellules infectées par le BTV (Mortola and Larsen, 2010).

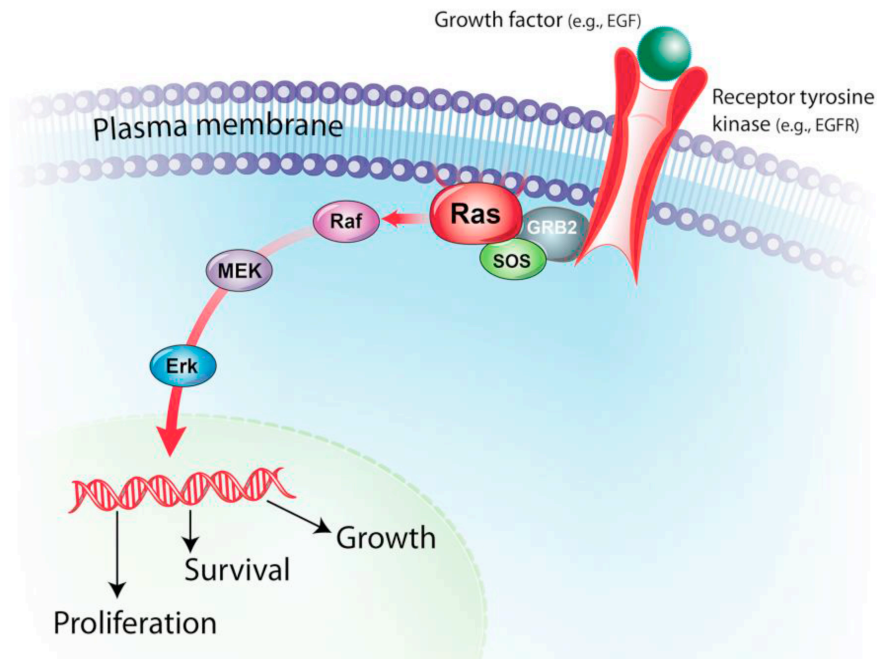


**Figure 9. Impact de la mutation P24 sur la virulence et l'expression de NS3.** (A) Alignement de séquences protéiques de NS3 de BTV1, 2, et 16. Les domaines d'interaction avec la calpactine (p11-BD) et les deux late-domains (L-domains) sont encadrés. Les résidus en gras et soulignés en rouge sont uniques au BTV2. (B) Courbes de survie de souris IFNAR<sup>-/-</sup> (n=10) infectées par injection intrapéritonéale avec les virus réassortants pour le segment 10 comme indiqué (10 PFU). (C) Graphique représentant la moyenne des valeurs de Cq de l'ARN du Seg2 à 4 jours p.i. avec les virus réassortants pour le Seg10. (D) Des cellules CPT-Tert ont été infectées avec les virus rBTV/1, 2, 2AA, 16 et 16AA (AA : code la même séquence peptidique que le Seg10 de BTV1) à une MOI de 0,01. Les cellules ont été collectées 18h p.i. et analysées par Western blot avec des anticorps dirigés contre NS3, NS1 et la tubuline. Les formes glycosylées de NS3 et NS3A sont indiquées par NS3-G et NS3a-G. Adapté de Ftaich et al. 2015.

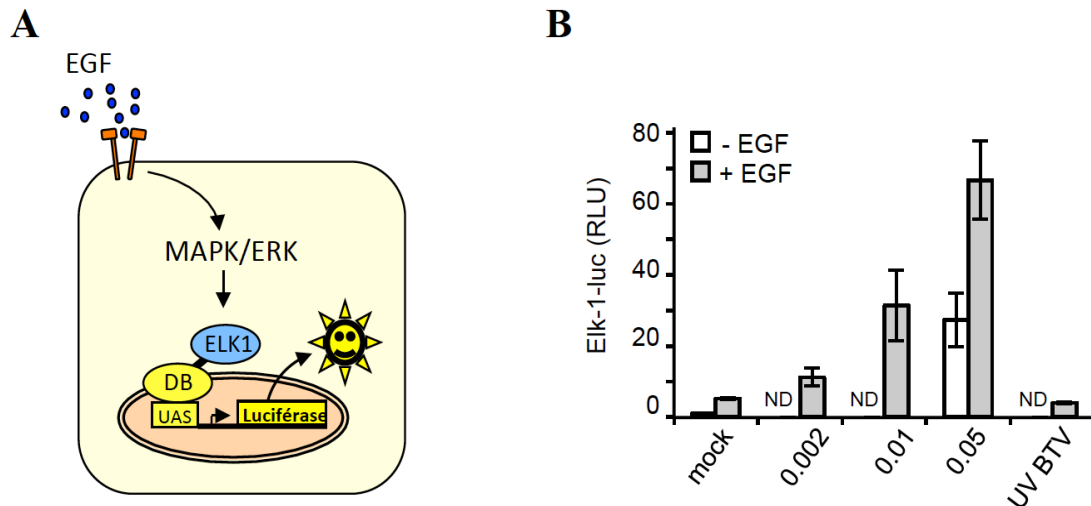
La voie MAPK/ERK module de nombreux processus cellulaires incluant la prolifération, la différenciation, le développement, la survie cellulaire et l'inflammation (**Figure 10**). Longtemps associée au processus de tumorigénèse des virus oncogènes (Miller and Raab-Traub, 1999), l'activation de cette voie de signalisation par des virus à ARN non oncogéniques semble favoriser la réplication et la propagation virale (Pleschka, 2008).

A travers ce projet, nous avons souhaité évaluer le rôle de la voie MAPK/ERK dans la réplication virale et préciser les mécanismes moléculaires à l'origine de cette activation (article en cours de soumission). Nous avons dans un premier temps confirmé l'activation de cette voie par le BTV en mesurant l'activité du facteur de transcription Elk1 via un test rapporteur et la phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 au niveau endogène. En outre, le BTV est capable d'activer efficacement la voie MAPK/ERK en absence d'une stimulation par l'EGF (**Figure 11**). A l'aide d'un virus inactivé aux UV, nous avons également pu montrer que la réplication virale était requise pour médier cet effet. L'activation de la voie MAPK/ERK apparaît essentielle au virus puisque la réplication apparaît inhibée dans des cellules infectées préalablement traitées avec l'U0126, un inhibiteur de la phosphorylation d'ERK1/2 (**Figure 12**). Par la suite, en surexprimant individuellement l'ensemble des ORFs de BTV dans des cellules 293T, les protéines NS3/3A sont apparues nécessaires et suffisantes pour induire une forte activation de la voie MAPK/ERK (**Figure 13**). De façon intéressante, cette propriété semble partagée par d'autres souches de BTV malgré des niveaux d'activation variables, mais semble en revanche abolie avec la protéine NS3 de l'EHDV, un orbivirus pourtant très proche du BTV (**Figure 14**). Enfin, la recherche sans a priori de partenaires cellulaires de NS3 par co-précipitation d'affinité associée à la spectrométrie de masse nous a permis d'identifier la protéine kinase B-Raf comme interactant putatif de NS3. B-Raf est essentielle à l'activation de MEK qui à son tour active les protéines ERK1/2 par phosphorylation. Nous avons confirmé cette interaction par GST-pulldown et observé une relocalisation de B-Raf vers NS3 dans des cellules infectées par le BTV ou surexprimant NS3 (**Figure 15-16**). De façon intrigante, seule la protéine NS3 de BTV est capable de lier B-Raf et non celles issues d'autres orbivirus tels que l'EHDV, l'AHSV et l'EEV.

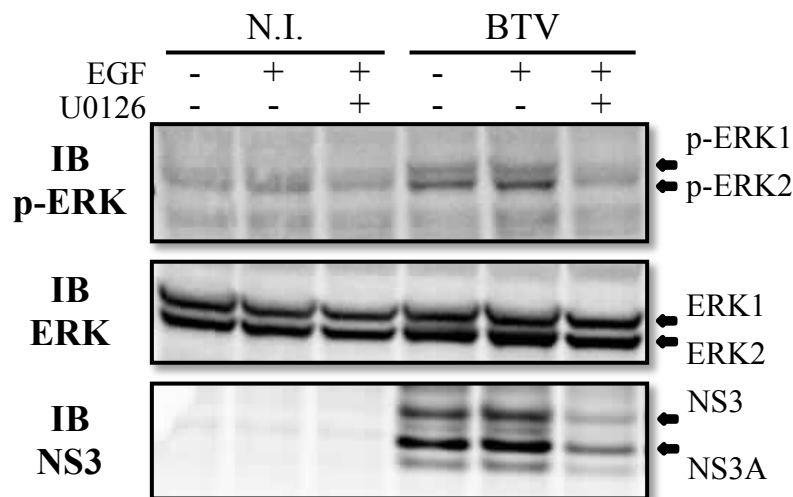
L'activation de B-Raf est dépendante de la protéine Ras qui agit en amont de celle-ci. Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation de B-Raf restent toutefois partiellement élucidés.



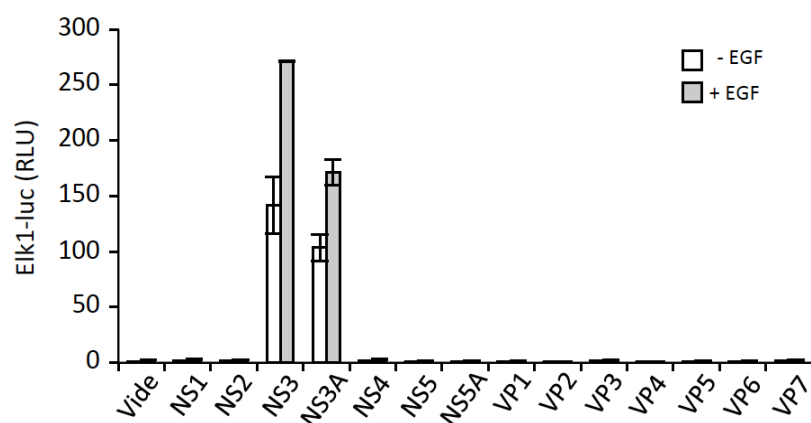
**Figure 10. Schéma général de la voie MAPK/ERK.** La voie MAPK/ERK est classiquement activée au niveau de la membrane plasmique en réponse à la liaison de facteurs de croissance sur leur récepteur à tyrosine kinase dédié (ex: récepteur à l'EGF). Cette activation est ensuite relayée par la protéine GRB2 qui est l'adaptateur cytosolique du récepteur à l'EGF. La protéine GRB2 va recruter la protéine SOS qui va activer en retour Ras. Ras active alors la kinase Raf qui induit une cascade de phosphorylation activant les protéines MEK1/2 qui conduisent à la phosphorylation des protéines ERK1/2. En retour, ERK1/2 activent des facteurs de traduction comme eIF4E et S6 et le facteur de transcription Elk1 dont les produits sont impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.



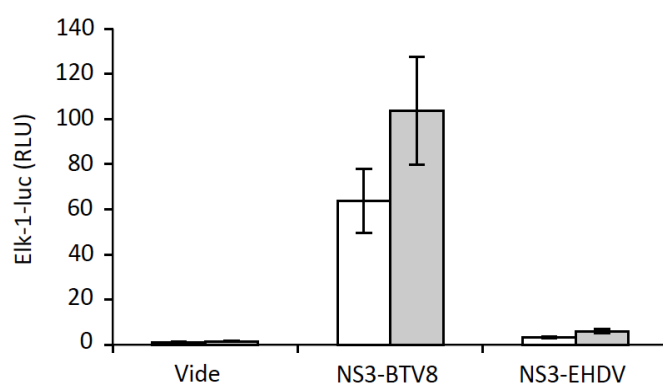
**Figure 11. Le BTV active la voie MAPK/ERK.** (A) La modulation de la voie MAPK/ERK par le BTV a été étudiée à l'aide d'un système de gène rapporteur luciférase qui permet de mesurer l'activation du facteur de transcription Elk1. Dans ce système Elk1 est fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 qui est nécessaire pour la fixation des séquences promotrices qui contrôle l'expression du gène rapporteur. L'ajout d'EGF active la voie MAPK/ERK et, par conséquent, l'activation du système rapporteur. (B) Des cellules 293T ont été transfectées avec le système Elk1-Luc puis infectées ou non avec différentes MOI de BTV8 inactivé ou non aux UV, en présence ou non d'EGF. Les cellules ont été lysées 20h p.i. pour mesurer l'activité du gène rapporteur Elk1-Luc au luminomètre.



**Figure 12. Le blocage de la voie MAPK/ERK inhibe la réplication du BTV.** Des cellules 293T traitées ou non à l'EGF puis ont été infectées ou non avec le BTV8 (MOI 0,01), en présence ou non d'un inhibiteur de MEK1/2 (U0126). Les cellules ont été collectées 16h p.i. et les lysats protéiques ont été analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre ERK1/2, phospho-ERK1/2 ou NS3.

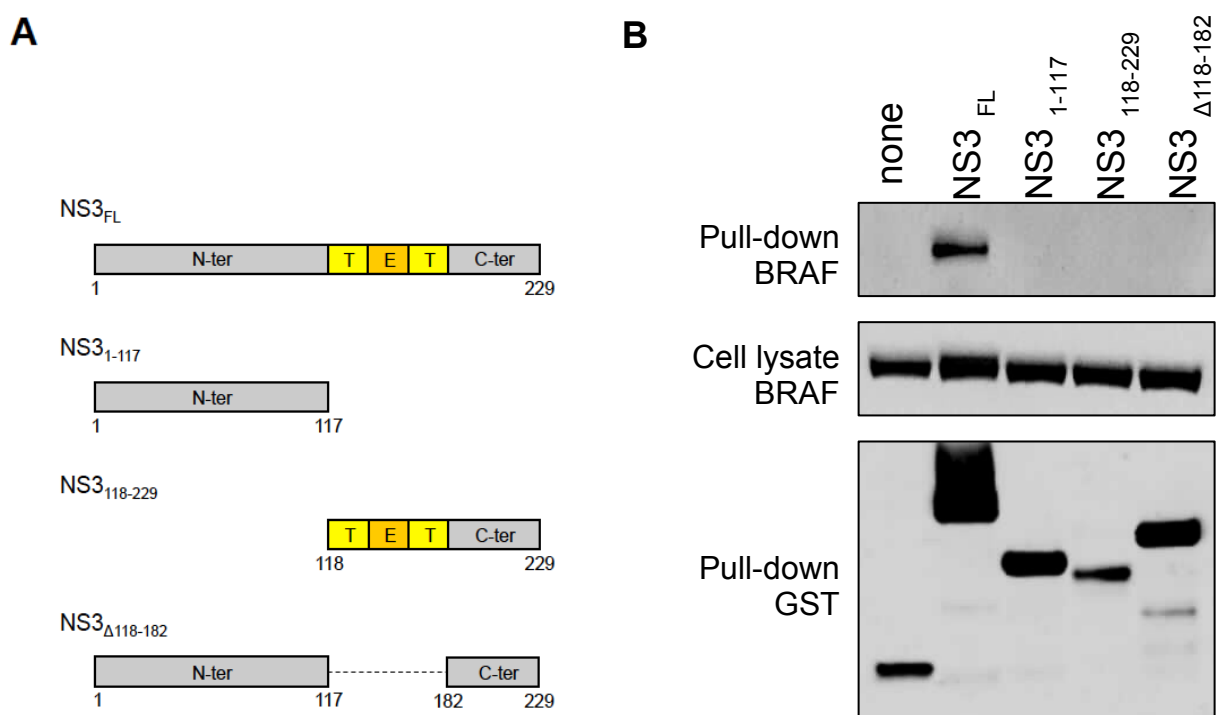


**Figure 13. La protéine NS3 de BTV active la voie MAPK/ERK.** Des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec le système rapporteur luciférase Elk1 et des plasmides d'expression codant pour les ORFs de BTV fusionnées à une étiquette 3xFLAG. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec de l'EGF (400 ng/ml). Après 24 h, l'activité luciférase a été mesurée à l'aide d'un luminomètre.

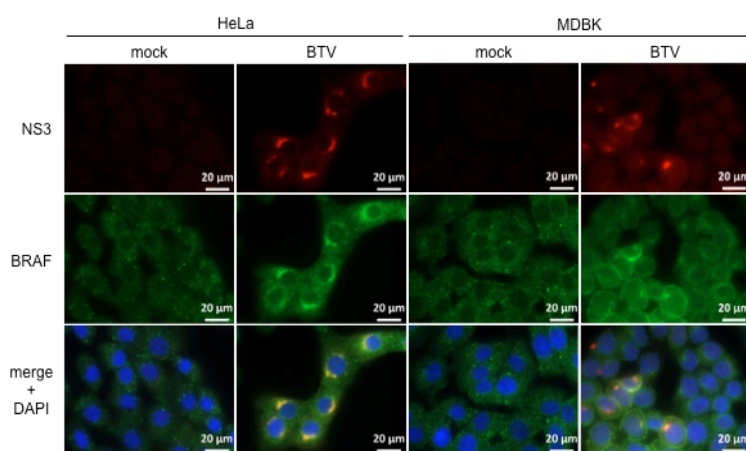
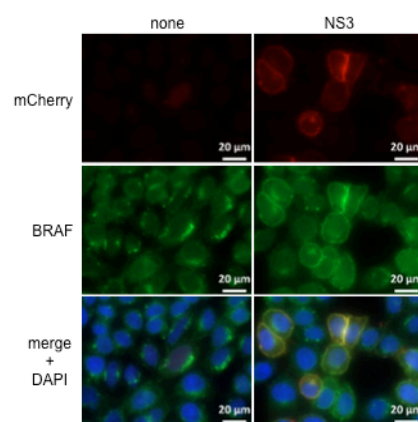


**Figure 14. Spécificité d'action de NS3 au sein des orbivirus.** Des cellules 293T ont été traitées comme dans la figure 13 en utilisant ici, comme vecteurs d'expression, des plasmides codant pour les protéines NS3 de BTV ou d'EHDV.





**Figure 15. La protéine NS3 de BTV interagit avec BRAF.** (A) Représentation schématique de la protéine NS3 de BTV et de différents mutants de délétion ; T=domaine transmembranaire, E=domaine extracellulaire. (B) Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec des vecteurs d'expression codant pour la GST exprimée seule ou en fusion avec la séquence complète ou des formes tronquées de NS3. Les lysats cellulaires ont été utilisés 48h post-transfection pour co-précipitation sur billes de Glutathion-sépharose. La présence de BRAF et des protéines de fusion GST a été recherchée par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques.

**A****B**

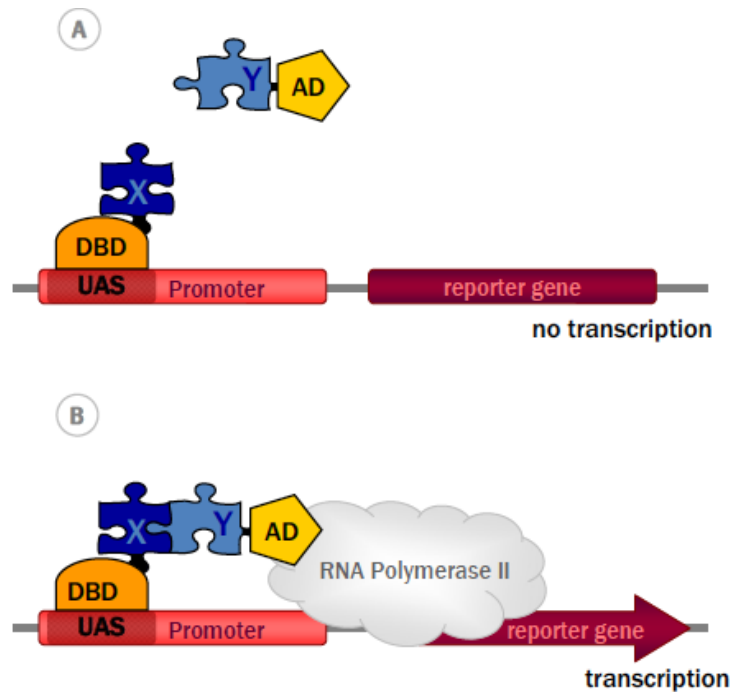
**Figure 16. Localisation subcellulaire de BRAF dans des cellules infectées par le BTV ou surexprimant NS3.** Des cellules HeLa (A-B) ou MDBK (A) ont été infectées avec du BTV8 (MOI=0.01) (A) ou transfectées avec un plasmide codant pour la protéine mCherry fusionnée ou non à NS3 (B). Après 24h, les cellules ont été fixées avec 4% de PFA et les noyaux ont été marqués à l'aide de DAPI. Les cellules ont ensuite été incubées avec des anticorps dirigés contre BRAF (A-B) ou NS3 (A). La localisation intracellulaire des noyaux (DAPI-bleu), de BRAF (vert) et de NS3 (rouge) a été visualisée par microscopie à fluorescence (x63).

Récemment, le groupe de Marc Therrien (Université de Montréal, Canada) a montré que l'activation de B-Raf était gouvernée par une interaction avec les protéines KSR qui servent de plateforme d'assemblage (Lavoie et al., 2018). On pourrait imaginer ainsi un rôle analogue pour NS3 qui permettrait d'aggréger les protéines B-Raf pour favoriser leur autoactivation.

### **2.1.3. Recherche de nouvelles interactions protéines-protéines entre le virus de la FCO et ses hôtes vecteur et mammifère**

Afin d'identifier de nouvelles fonctions pour les protéines du BTV dans la pathogenèse virale et/ou la restriction d'hôtes, une recherche systématique de partenaires cellulaires pour l'ensemble des ORFs (orféome) viraux a été initiée. Pour ce faire, j'ai souhaité développer au laboratoire une activité de plateforme double-hybride en levure, méthode reconnue pour l'étude des interactions protéine-protéine. La mise en place de cette activité a été grandement facilitée par le recrutement, comme post-doctorant puis en tant qu'ingénieur de recherche INRA, de Grégory Caignard, ancien thésard de Pierre-Olivier Vidalain à l'Institut Pasteur et qui a été formé par ce dernier à l'outil double-hybride.

Le principe du double-hybride repose sur les propriétés du facteur de transcription Gal4, codé par la levure, lequel comprend deux domaines fonctionnels : DNA-binding domain (DBD), activating domain (AD) (Brückner et al., 2009). Le domaine DB se fixe spécifiquement sur son promoteur tandis que le domaine AD permet la transactivation d'un gène rapporteur, par exemple le gène *HIS3* qui permet la croissance des levures en absence d'histidine (**Figure 17**) (Vidal and Fields, 2014). Ces deux domaines peuvent être découplées et fusionnées à une protéine appât et une protéine proie dont on cherche à tester l'interaction. Quand l'appât et la proie n'interagissent pas, les deux domaines du facteur Gal4 restent dissociés, la transcription du gène *His3* n'est pas activée et les levures ne peuvent donc pas se développer sur un milieu dépourvu d'histidine. En revanche, si l'appât et la proie interagissent, le facteur Gal4 est reconstitué et peut activer le gène rapporteur *His3*, permettant alors la croissance des levures. Notre objectif était donc de rechercher de nouvelles proies cellulaires à partir d'appâts viraux codés par le BTV. L'ensemble des ORFs du BTV8 a tout d'abord été cloné par la technologie Gateway. Cette méthode permet le transfert de manière directionnelle par recombinaison homologue des séquences d'intérêt amplifiées par PCR dans un vecteur d'entrée (pDONR207 ; réaction BP), lesquels peuvent ensuite être transférés par une seconde réaction (réaction LR) dans différents vecteurs d'expression en fonction des applications souhaitées.

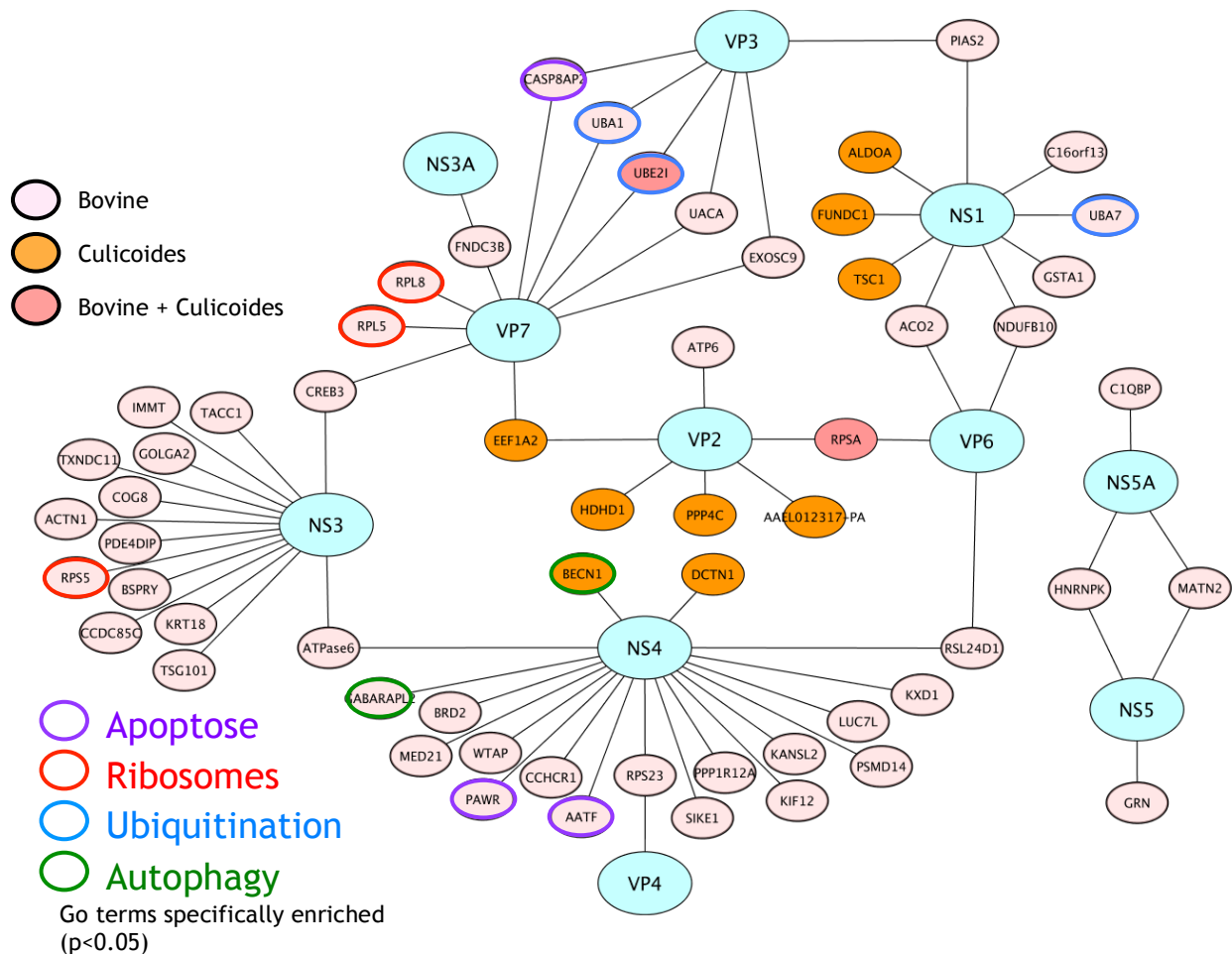


**Figure 17. Principe du double-hybride en levure.** (A) La protéine d'intérêt X, aussi dénommée appât, est fusionnée au domaine de liaison du facteur de transcription Gal4 (DBD). L'interacteur protéique potentiel Y, dénommé proie, est fusionné au domaine d'activation de GAL4 (AD). (B) La protéine appât (DBD-X) se lie à la séquence transactivatrice (UAS) du promoteur. L'interaction entre les protéines appât et proie (AD-Y) permet le recrutement du domaine AD et reconstitue ainsi un facteur de transcription fonctionnel, conduisant au recrutement de l'ARN polymérase II et la transcription subséquente d'un gène rapporteur. Adapté de Brückner et al. (2009).

L'ORFéome complet du BTV8 a donc été cloné dans un plasmide pPC97 qui contient la séquence Gal4-DB. Afin de rechercher des nouveaux partenaires cellulaires, ces constructions ont été utilisées individuellement comme appâts pour cribler deux banques d'ADNc (exprimés en fusion avec la séquence Gal4-AD) issues des hôtes naturels de BTV : une banque issue de l'hôte bovin (lignée MDBK) et une banque provenant du vecteur culicoïde (lignée KC). Le protocole de criblage passe par l'utilisation des souches de levure Y2H-Gold et Y187. Ces souches sont transformées respectivement par un vecteur contenant l'ORF virale (l'appât) fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4-DB) et par un vecteur contenant une banque d'ADNc comme proie fusionnée au domaine d'activation de Gal4 (Gal4-AD). Ces vecteurs sont réunis par conjugaison des deux souches de levure de type sexuel opposé et les deux protéines chimères (l'appât et la proie) sont testées pour leur interaction par transactivation du gène rapporteur HIS3. La dernière partie du protocole consiste à amplifier à l'aide d'amorces génériques l'ADNc de la proie cellulaire impliquée dans l'interaction et à séquencer le produit amplifié. Afin d'automatiser l'analyse des électro-chromatogrammes de séquence, un BLAST multiparallèle dirigé contre différentes banques (ENSEMBL, GenBank, Uniprot) a été développé en collaboration avec Yannick Blanchard et les bioinformaticiens de l'Anses de Ploufragan. Enfin, les interactants peuvent être représentés sous forme de cartes grâce au logiciel Cytoscape.

A ce jour, nous avons donc criblé 13 protéines virales de BTV8 contre les banques KC et MDBK. Plus de 800 colonies de levure positives ont été analysées conduisant à l'identification de 663 interactions dont une majorité avec la banque bovine. Nous avons pu identifier au total 135 interacteurs cellulaires, dont un peu moins de la moitié ont été identifiés deux fois ou plus.

Ces interactants peuvent être représentés sous la forme de carte (**Figure 18**). On remarque d'emblée que la plupart des interactants ont été obtenus avec la banque bovine puisqu'on a retrouvé spécifiquement que 9 interacteurs avec la banque culicoïde. Par ailleurs, ces interactions sont distinctes entre l'hôte mammifère et l'hôte vecteur à l'exception d'une protéine, la protéine UBE2I, qui est retrouvée avec les deux banques, ce qui pourrait suggérer une conservation de cette interaction entre l'hôte vecteur et l'hôte mammifère. On note également que certaines protéines sont hyperconnectées comme NS4 ou NS3 tandis que d'autres protéines ont peu de partenaires voire pas du tout.



**Figure 18. Cartographie des interactions des protéines de BTV8 avec ses hôtes arthropode et bovin.** Réseau d'interactions obtenu à l'aide du logiciel Cytoscape. Uniquement les interactions retrouvées deux fois ou plus par double-hybride sont représentées. Les protéines virales apparaissent en bleu, les protéines bovines et de culicoides apparaissent respectivement en rose et orange. Les partenaires partagés par les deux hôtes sont représentés en gris. Les partenaires appartenant à des processus cellulaires significativement enrichis sont entourés d'une couleur distincte pour chaque process.

De façon intéressante, certaines protéines virales partagent des interactions communes avec des protéines cellulaires : c'est le cas pour la protéine UBE2I partagée entre NS1 et VP7, mais également pour les protéines VP3 et VP7 qui partagent des interactions avec deux protéines cellulaires. Si on regarde maintenant les voies cellulaires majoritairement représentées sur cette carte, on retrouve des voies classiquement détournées par les virus comme des voies ribosomales, l'ubiquitination/sumoylation, avec UBE2I ou encore UBA7 et UBA1, l'apoptose, mais aussi l'autophagie avec notamment la bécline 1. Cela nous donne ainsi des arguments indirects sur la pertinence de ces cribles.

En perspectives de ce travail, nous avons débuté la même approche avec le BTV27 qui présente la particularité d'infecter uniquement les chèvres sans provoquer de signe clinique, avec une voie de transmission probablement directe. Nous espérons pouvoir identifier des traits communs aux BTV8 et BTV27 mais également des déterminants spécifiques à l'un ou l'autre de ces sérotypes pouvant expliquer certains mécanismes de transmission du BTV.

#### **2.1.4. Autres projets**

En parallèle des projets mentionnés plus haut, j'ai participé à des études portant sur la persistance des anticorps colostraux anti-BTV (Vitour et al., 2011), le diagnostic des orbivirus (Zientara et al., 2012)(Breard et al., 2016; Viarouge et al., 2015)(Bréard et al., 2018b), l'épidémiologie des orbivirus (Bréard et al., 2016; Courtejoie et al., 2018a, 2018b; Sailleau et al., 2014, 2017b, 2017a, 2018; Viarouge et al., 2014), l'émergence du BTV27 (Bréard et al., 2018a; Schulz et al., 2016; Zientara et al., 2014), la vaccination anti-BTV (Breard et al., 2015; Mohd Jaafar et al., 2014), la virulence du BTV (Ftaich et al., 2015).

## 2.2. Le virus Schmallenberg (Schmallenberg virus, SBV)

### 2.2.1. Découverte

A la fin de l'été-automne 2011, une maladie non identifiée était reportée chez des bovins en Allemagne, aux Pays-bas et en Belgique (Vitour et al., 2011). Les signes cliniques observés étaient généralement aspécifiques avec de la fièvre, une chute de la production laitière et des épisodes diarrhéiques, sans que l'agent causal puisse être identifié. En novembre 2011, l'analyse d'échantillons de sang d'animaux infectés par séquençage à haut débit permit de détecter des séquences génomiques virales inconnues. Ce nouveau virus fut dénommé Schmallenberg (SBV) du nom de la ville d'où provenaient les prélèvements sanguins. Des analyses phylogénétiques permirent d'associer le SBV au séro groupe Simbu, au sein du genre *Orthobunyavirus* dans la famille des *Peribunyaviridae*. Ce séro groupe comprend notamment les virus Akabane (AKAV), Aino et Shamonda (SHAV). En décembre 2011, la présence du SBV était rapportée en Belgique et aux Pays-Bas où un effet tératogène était décrit pour la première fois chez des fœtus de bovins et ovins malformés. Au début de l'année 2012, la France et la Grande-Bretagne rapportèrent leurs premiers cas de SBV. En France, le génome viral fut détecté par RT-qPCR à partir de prélèvement de cerveaux issus d'agneaux malformés provenant de Moselle et Meurthe-et-Moselle. Dans les mois suivants, le virus se propageait dans d'autres pays européens et en Octobre 2012, la présence du SBV était rapportée dans près de 6000 élevages. Il fut rapidement démontré que le SBV se transmettait par l'intermédiaire de moucheron hémaphages appartenant au genre *Culicoides* (Doceul et al., 2013).

### 2.2.2. Classification

La classification des bunyavirus au sein de l'ordre des *Bunyavirales* a été révisité récemment par l'ICTV. Le genre *Orthobunyavirus* auquel appartient le SBV est désormais regroupé dans la famille des *Peribunyaviridae* qui comprend également le genre *Herbivirus*. Les virus tels que le virus de la Vallée du Rift (Rift Valley fever virus, RVFV ; *Phlebovirus*), le virus Akabane (Akabane virus, AKAV ; *Orthobunyavirus*) et le virus de Nairobi (Nairobi sheep disease virus, NSDV ; *Orthonairovirus*) sont des pathogènes importants en médecine vétérinaire. D'autres virus comme les hantavirus, responsables de fièvre hémorragique et de syndromes rénaux et pulmonaires ou le virus de la fièvre de Crimée-Congo (Crimean-Congo



hemorrhagic fever virus, CCHF ; *Orthonairovirus*), peuvent provoquer des maladies sévères chez l'Homme. La majorité des bunyavirus sont transmis par des vecteurs arthropodes, - en particulier les moustiques, les phlébotomes, les culicoïdes, les tiques et les thrips – à l'exception des hantavirus qui sont transmis par les rongeurs.

Les virus apparentés au SBV tels que les virus Sathuperi, SHAV, AKAV ou Aino n'ont jusqu'à présent jamais été identifiés en Europe. Les virus AKAV et Aino sont présents en Extrême Orient et en Australie, tandis que le virus Akabane a été retrouvé en Israël et en Turquie (Taylor and Mellor, 1994). Le virus SHAV a quant à lui été détecté au Nigéria dans les années 1960 et a depuis été isolé au Japon en 2005 (Yanase et al., 2005). Malgré sa découverte récente, il ne fait aucun doute que ses origines sont anciennes résultant probablement d'une co-évolution avec des virus génétiquement proches (Goller et al., 2012; Hoffmann et al., 2012; Yanase et al., 2012).

### **2.2.3. Signes cliniques et pathogenèse**

La maladie parfois associée à l'infection par le SBV se manifeste chez le bovin adulte par une baisse de la production laitière pouvant atteindre 50%, de la fièvre et une diarrhée pouvant être sévère, le tout rétrocedant en une semaine en général, sans conséquences ni mortalité associée. Les moutons et les chèvres semblent très peu affectés par l'infection à SBV (Doceul et al., 2013). La virémie induite par le SBV est très courte et dure généralement entre 2 et 6 jours chez les bovins (Hoffmann et al., 2012). Peu après sa découverte, les Pays-bas rapportèrent un effet tératogène du SBV chez les moutons avec des manifestations cliniques comparables à celles observées avec les virus AKAV et Aino. Les femelles infectées sont capables de transmettre le virus aux fœtus (ovin, bovin, caprin), qui développent des malformations atypiques conduisant le plus fréquemment à la mort in-utero ou immédiatement après la naissance. Les malformations congénitales et les signes cliniques les plus communs observés chez les avortons ou les animaux mort-nés incluent des désordres neuro-musculo-squelettiques comprenant des arthrogryposes, torticolis, ankyloses, kyphoses, scolioses, brachygnathies inférieures et des désordres neurologiques tels des ataxies, porencéphalies, hydraencéphalies et/ou des anomalies comportementales (Doceul et al., 2013) (**Figure 19**).



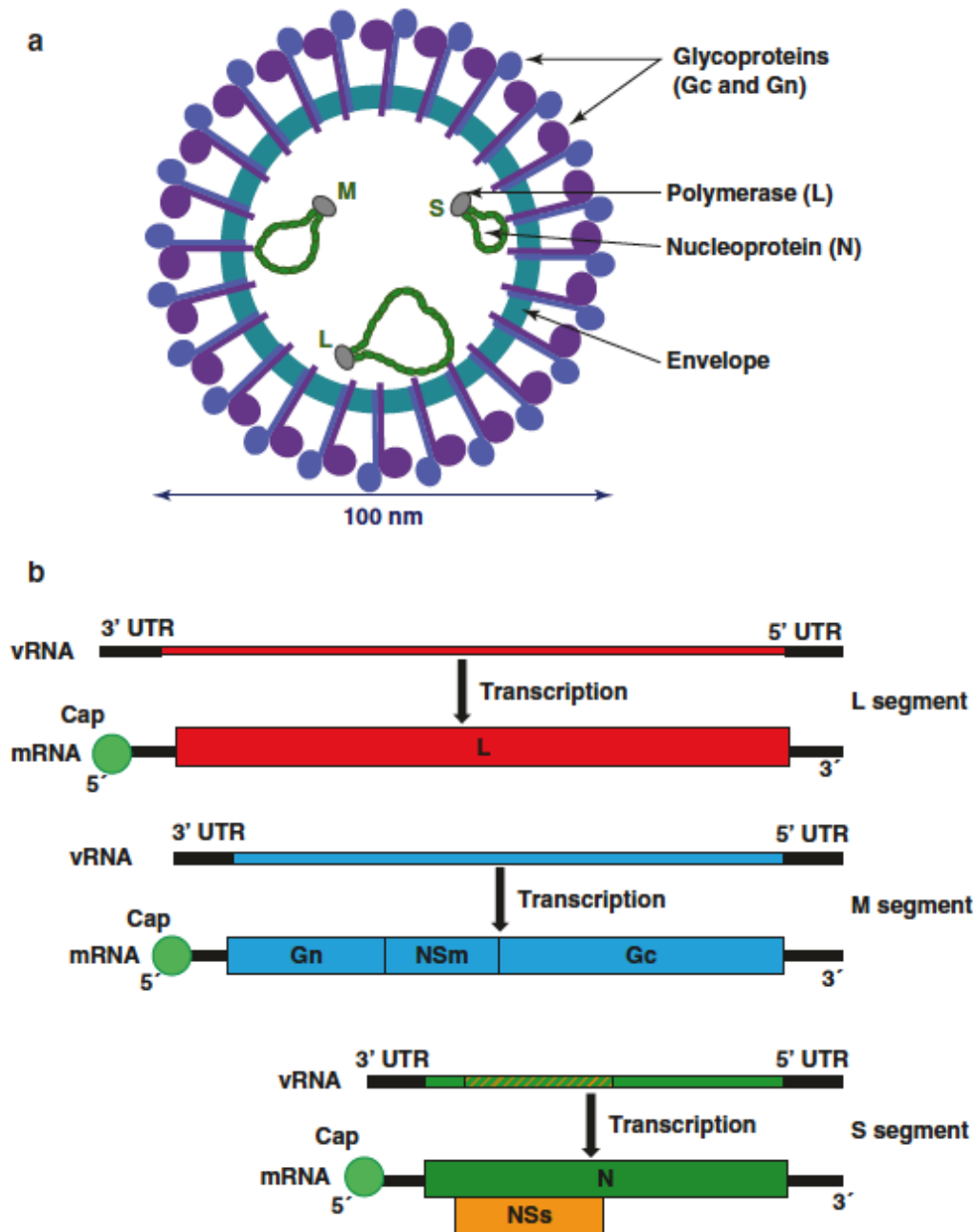
**Figure 19. Avortons d'ovins (A-C) et de bovins (D-F) infectés par le virus Schmallenberg.** (A-B) Arthrogrypose. (B) Raccourcissement des tendons du jaret. (C) Hydranencéphalie. (D) Métatarses disproportionnés. (E) Torticollis. (F) Hydranencéphalie. Source (ovin) : Laboratoire vétérinaire et alimentaire départemental de Meurthe-et-Moselle (LVAD 54). Source (bovin) : Dierengezondheidszorg Vlaanderen (Belgique).

La sévérité des signes cliniques chez le fœtus dépend du moment de l'infection au cours de la gestation, les dommages étant les plus importants au moment de la différenciation des tissus neuronaux (Doceul et al., 2013; Laloy et al., 2017).

#### **2.2.4.NSs : un facteur de virulence essentiel du SBV**

Le génome des bunyavirus se compose de trois segments d'ARNsb de polarité négative : les segments L (large), M (medium) et S (small) (**Figure 20**). Les phlébovirus et les tospovirus diffèrent des autres bunyavirus par le fait que leur segment S adopte une stratégie de codage ambisens. Le segment L code pour l'ARN polymérase ARN dépendante. Le segment M code pour un précurseur polyprotéique qui est clivé co-translationnellement pour générer les glycoprotéines Gn et Gc et la protéine non structurale NSm. Enfin, le segment S code pour la nucléoprotéine N et la protéine non structurale NSs via un décalage du cadre de lecture.

Afin d'étudier le rôle de NSs de SBV comme facteur de virulence, un mutant de délétion de NSs (SBVΔNSs) a été produit par génétique inverse par le groupe de Massimo Palmarini (CVR, Glasgow). Sa virulence a ensuite été testée dans des souris Swiss NIH infectées par inoculation intracérébrale. Les souris infectées avec le virus SBVΔNSs présentaient un phénotype atténué, caractérisé par un retard dans le décès en comparaison avec le virus sauvage, témoignant d'un rôle de NSs comme facteur de virulence (Varela et al., 2013). *In vitro*, le virus SBVΔNSs est capable d'induire la production d'IFN dans plusieurs lignées cellulaires, contrairement au virus sauvage, démontrant que NSs inhibe la réponse IFN chez son hôte (Kraatz et al., 2015; Varela et al., 2013). La protéine NSs de SBV possède aussi la capacité d'induire la dégradation de la sous-unité RPB1 de l'ARN polymérase II *in vitro* et conséquemment d'inhiber la transcription et la synthèse protéique. L'inhibition de la réponse IFN par NSs serait donc une conséquence d'une inhibition globale de la transcription (Barry et al., 2014). Une étude transcriptomique confirmait l'effet de la NSs de SBV sur la transcription des gènes cellulaires, même si cette inhibition se révèle incomplète puisque des gènes antiviraux sont toujours induits au cours de l'infection par le SBV (Blomstrom et al., 2015). A noter enfin que la NSs de SBV est également capable d'induire l'apoptose *in vitro* (Barry et al., 2014).



**Figure 20. Représentation schématique de la particule du SBV (a) et organisation génomique (b).** (a) Le génome est composé de trois segments d'ARNsb (-) (Large (L), medium (M) et small (S)) qui s'associent à la nucléoprotéine et à la polymérase virale pour former les complexes RNPs. (b) Chaque segment possède une région codante flanquée de deux séquences non codantes (UTR) 5' et 3'. Les nucléotides des extrémités 5' et 3' sont complémentaires, permettant la formation de structures stables dites « panhandles » utilisées pour initier la transcription et la réplication. La polymérase L transcrit l'ARN génomique (vRNA) en ARNm, qui contiennent des séquences dérivées de l'hôte à l'extrémité 5' (coiffe). L'ARNm du segment L code pour l'ARN polymérase L. Le segment M code pour une polyprotéine qui est processée par clivage protéolytique pour générer les glycoprotéines Gn et Gc et la protéine non structurale NSm. Le segment S code pour la protéine N et la protéine non structurale NSs, traduite à partir d'un second cadre de lecture par leaky scanning. Adapté de Doceul et al. (2017).

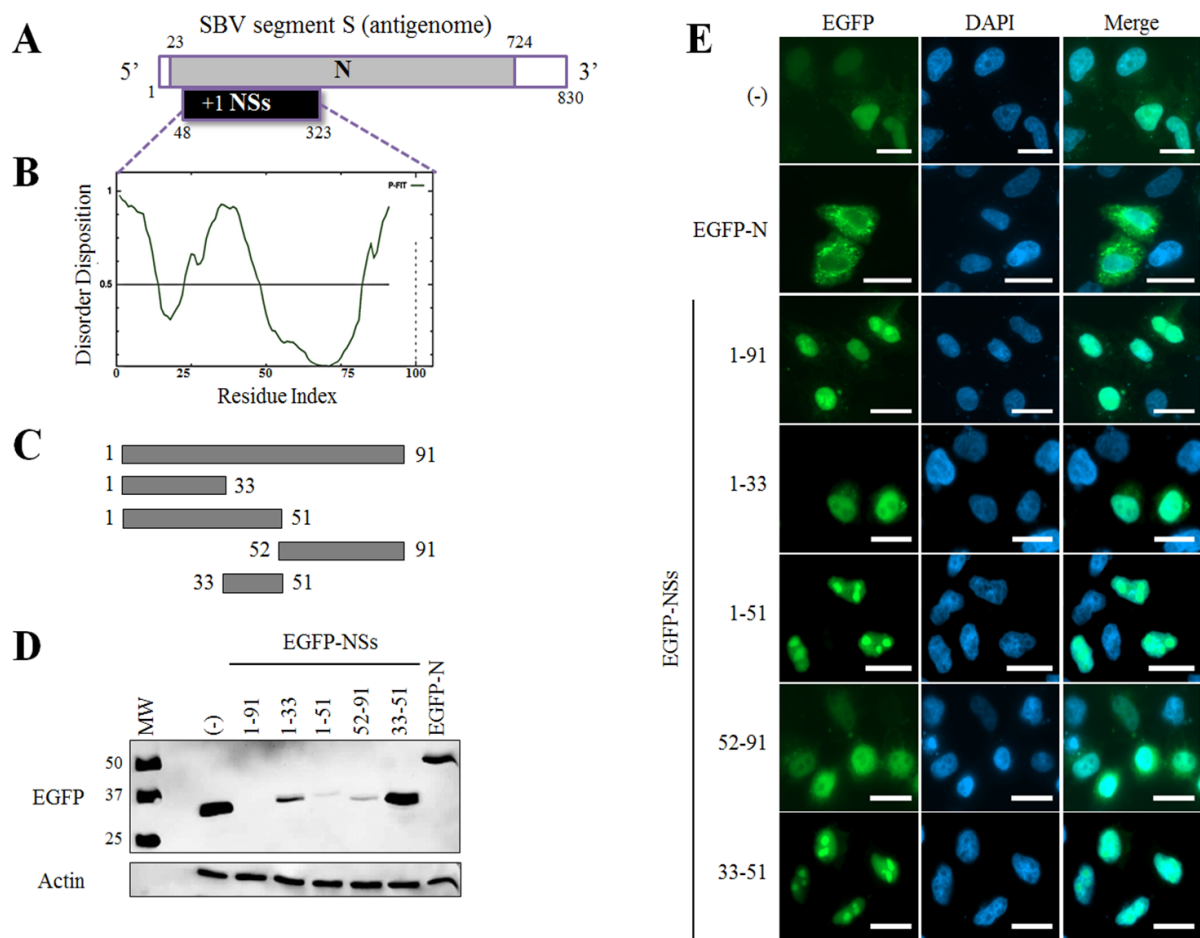
NSs code pour une protéine de 91 a.a. qui s'avère très faiblement détectable dans des cellules infectées par le SBV ou après surexpression (Barry et al., 2014). Ce défaut d'expression pourrait être attribué à la présence de domaines désordonnés aux extrémités N- et C-terminales ainsi qu'au niveau d'un domaine central comprenant les résidus 33 à 51 (**Figure 21A-D** ; (Gouzil et al., 2017)). De façon intéressante, l'expression de séquences de NSs fusionnées à l'EGFP montre une localisation évocatrice du nucléole pour des constructions contenant le domaine 33-51 (**Figure 21E**). Cette hypothèse était confirmée par microscopie confocale avec la présence d'un net co-marquage de ce domaine minimum avec des protéines résidentes du nucléole telles que la fibrillarine ou la nucléophosmine (B23) (**Figure 22A**). La prédiction via le serveur NoD d'une séquence nucléolaire (NoLS) dans cette région 33-51 venait soutenir cette observation (**Figure 22B**). L'expression de la séquence complète de la NSs fusionnée à l'EGFP montre un marquage uniquement partiel avec le nucléole qui semble au contraire désorganisé en présence de la protéine virale. Ces résultats suggèrent que la NSs serait localisée au niveau des nucléoles, par un motif central, mais entraînerait dans le même temps sa redistribution dans le noyau. Des expériences de cinétiques d'infection montrent que cette désorganisation du nucléole intervient très tôt au cours de l'infection par le SBV, précédant notamment la dégradation de la protéine Rpb1 (**Figure 23**).

Nous nous sommes attachés à identifier les résidus essentiels à l'activité NoLS par mutagenèse dirigée et nous avons pu souligner l'importance de 2 triplets de résidus basiques : RRR (39-41) et RRH (48-50). En effet, des mutations introduites dans l'un ou l'autre de ces triplets impactent grandement sur la répartition nucléolaire de la protéine (**Figure 24**).

Enfin, nous avons montré qu'un virus muté dans le site NoLS perd significativement sa capacité à inhiber la transcription cellulaire, suggérant un lien entre la localisation nucléolaire de la NSs et sa fonction inhibitrice des synthèses cellulaires (**Figure 25** ; (Gouzil et al., 2017)).

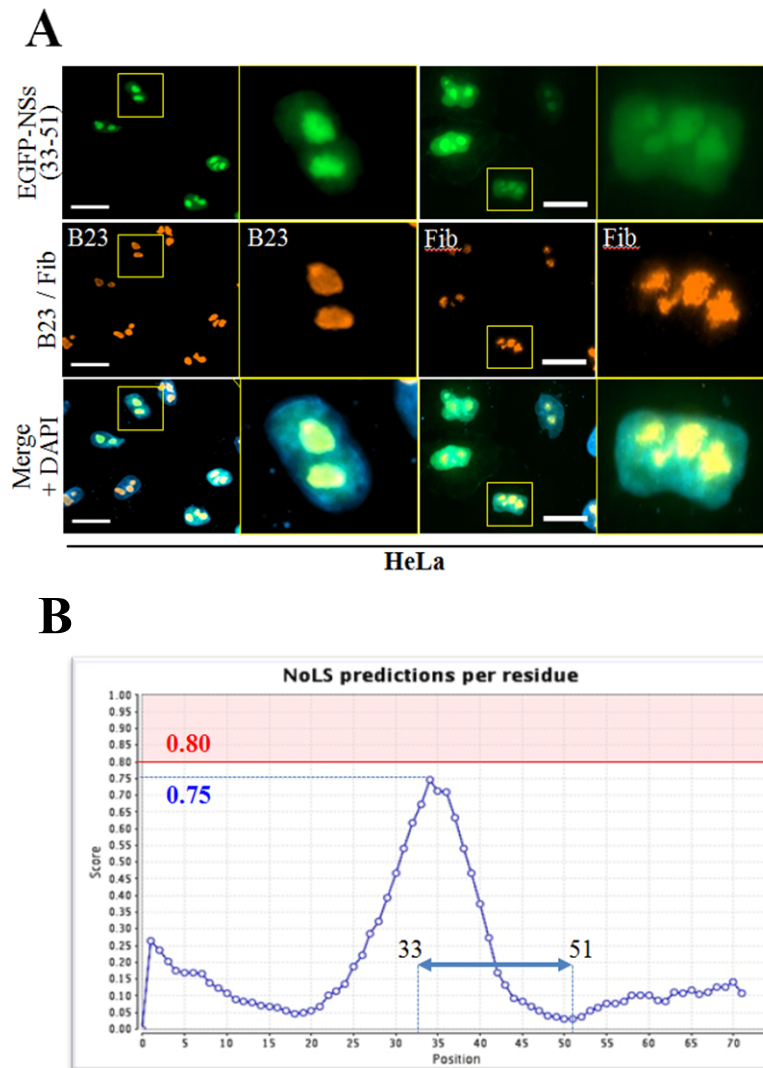
### 2.2.5. Autres projets

En parallèle des travaux cités ci-dessus, j'ai participé à des études portant sur l'émergence du SBV en France (Breard et al., 2013; Sailleau et al., 2013a, 2013b) et la détection de SBV infectieux dans le sperme de taureaux infectés (Ponsart et al., 2014).

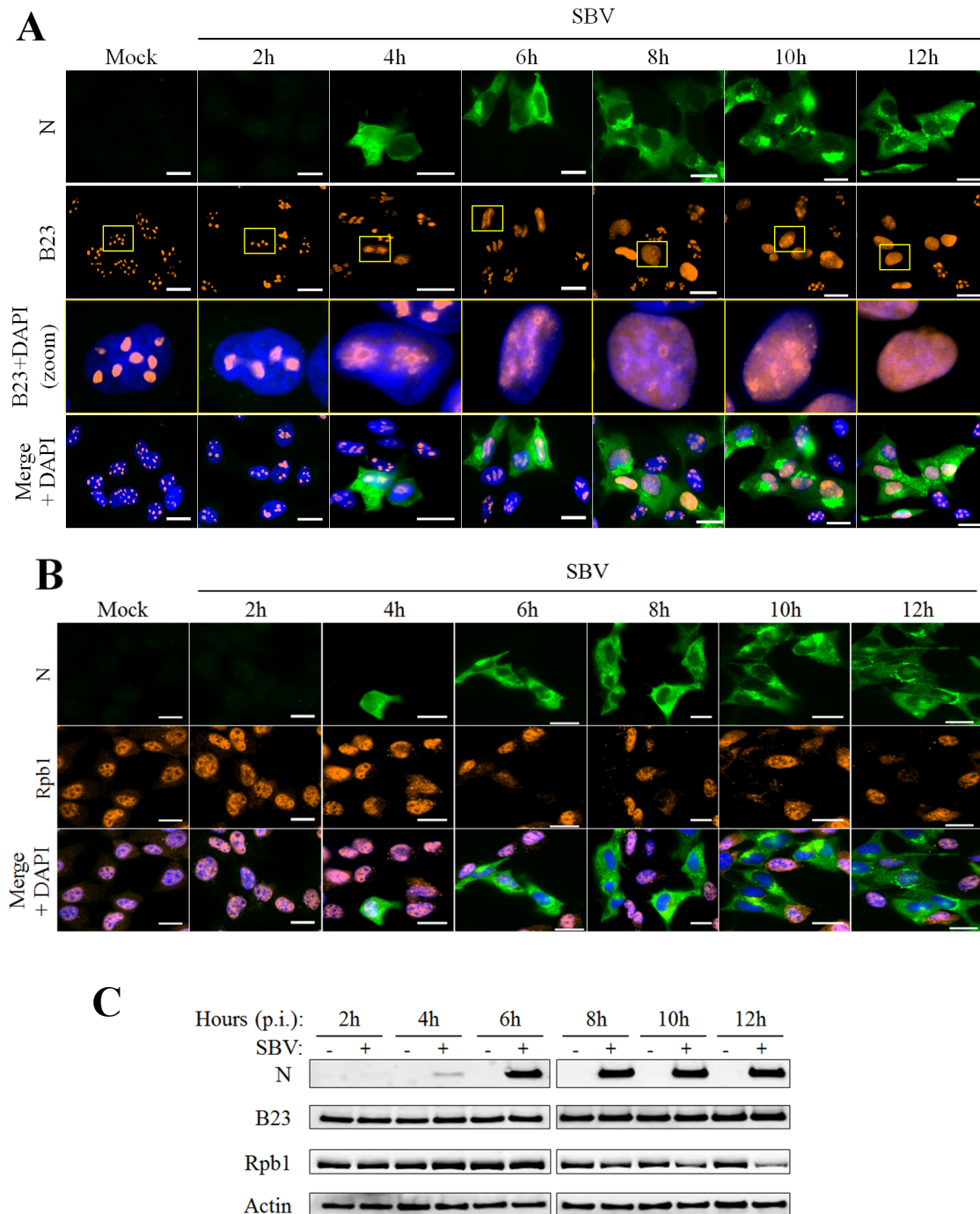


**Figure 21. Expression et localisation de mutants de la protéine NSs de SBV.** (A) Représentation schématique du segment S de SBV (orientation sens). Les régions non codantes 5' et 3' sont indiquées en blanc. Le cadre de lecture (ORF) de la protéine N est localisé entre les nucléotides 23 et 724. La séquence NSs est contenue dans un ORF +1 entre les nucléotides 48 et 323. (B) Prédiction des résidus intrinsèquement désordonnés dans NSs à l'aide de PONDR-FIT. (C) Représentation schématique des constructions de NSs utilisées en (D) et (E). (D) Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec 500 ng pEGFP-C1, pEGFP-N ou différents mutants pEGFP-NSs comme indiqué. 24h post-transfection, les cellules ont été lysées et les lysats protéiques utilisés pour détecter la présence des constructions EGFP par Western blot. (E) Des cellules HeLa ont été transfectées comme décrit en (D). 24h post-transfection, les cellules ont été fixées avec 4% PFA et marquées au DAPI (bleu) pour visualiser les noyaux. La localisation intracellulaire des constructions de fusion EGFP (vert) a été appréciée par microscopie à fluorescence (grossissement x63). Les barres représentent 20  $\mu$ m. Adapté de Gouzil et al. (2017).



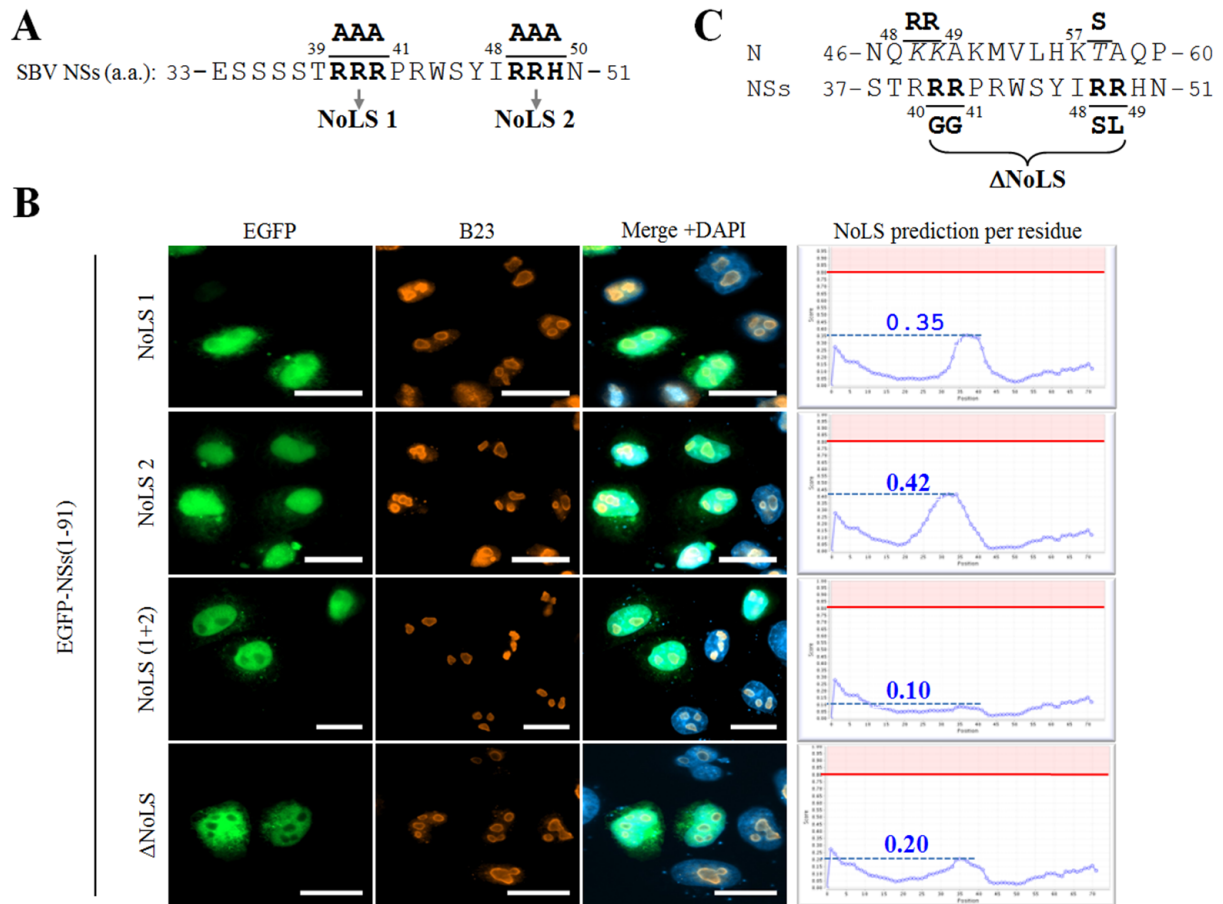


**Figure 22. La protéine NSs de SBV contient un domaine de localisation nucléolaire.** (A) Des cellules HeLa ont été transfectées avec 500 ng de pEGFP-NSs 33-51. 24h post-transfection, les cellules ont été fixées avec 4% PFA and marquées au DAPI, pour visualiser les noyaux, et avec des anticorps spécifiques dirigés contre B23 et la fibrillarine (Fib). La localisation intracellulaire des noyaux (bleu), de la construction EGFP-NSs 33-51 (vert), et des protéines B23 et fibrillarine (rouge) a été observée par microscopie à fluorescence (grossissement x63). Les barres représentent 20  $\mu$ m. (B) Représentation graphique de prédiction de NoLS dans la séquence peptidique de NSs de SBV à l'aide du logiciel NoD. La ligne rouge matérialise la limite de prédiction de NoLS. Adapté de Gouzil et al. (2017).

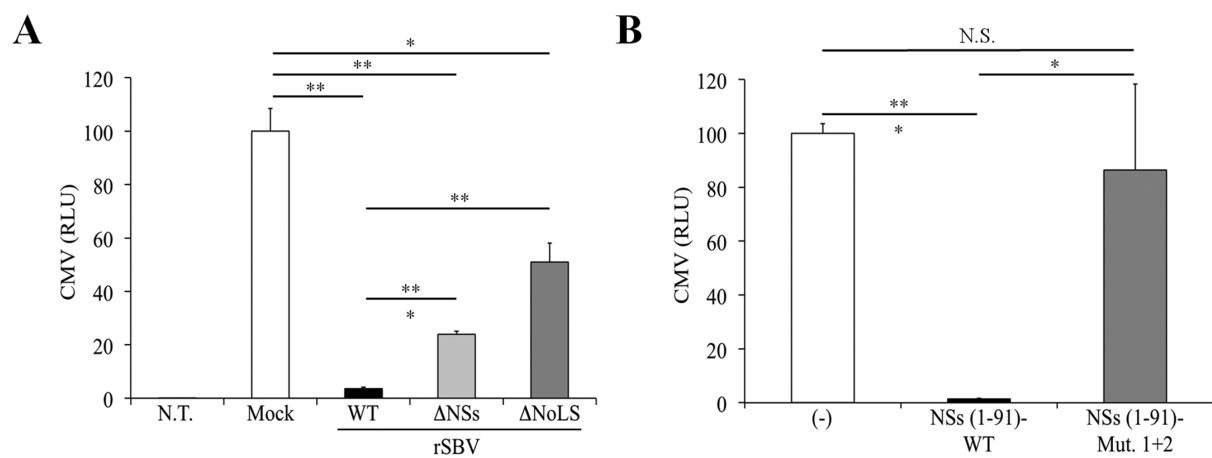


**Figure 23. Le SBV induit une réorganisation nucléolaire à des temps précoces de l'infection.** (A-C) Des cellules CPT-Tert ont été infectées par le SBV WT (MOI=0,1). A différents temps p.i (2h à 12h), les cellules ont été fixées avec 4% PFA pour étudier la localisation subcellulaire de B23 et de la N de SBV par microscopie à fluorescence (A-B) ou lysées pour analyser l'expression par Western blot des protéines B23, Rpb1, N de SBV et  $\beta$ -actine. (A-B) Après fixation, les cellules ont été marquées au DAPI (bleu) pour repérer les noyaux et marquées avec des anticorps spécifiques dirigés contre B23 (rouge), Rpb1 (rouge) et la N de SBV (vert) (grossissement x63). Les barres d'échelle représentent 20  $\mu$ m. Adapté de Gouzil et al. (2017).





**Figure 24. Impact de mutations ponctuelles sur la localisation nucléolaire de NSs.** (A) Séquence peptidique de la région 33-51 de la NSs de SBV. Les triplets de résidus basiques correspondant au NoLS putatif (NoLS 1 et 2) sont représentés en gras. (B) Des cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions pEGFP-NSs (1-91) mutées dans le NoLS 1, NoLS 2, ou les deux (NoLS 1+2), et ΔNoLS. 24h post-transfection, les cellules ont été fixées avec 4% PFA et ont ensuite été marquées au DAPI (bleu), pour repérer les noyaux, et avec un anticorps spécifique dirigé contre B23 (rouge). La localisation intracellulaire des constructions EGFP (vert), des noyaux marqués au DAPI (bleu) et de B23 (rouge) a été visualisée par microscopie à fluorescence (grossissement x63). Les barres d'échelle représentent 20 μm. Chaque graphique représente la prédiction NoLS pour chaque mutant NSs SBV. La ligne rouge matérialise la limite de prédiction de NoLS et la ligne bleue le score atteint par NSs. (C) Séquence peptidique de la région 37-51 de NSs et 46-60 de N. Les mutations NoLS minimales introduites dans le virus recombinant ont été dénommées ΔNoLS et sont reportées en gras sous la séquence de la NSs. Adapté de Gouzil et al. (2017).



**Figure 25. Rôle du motif NoLS dans l'action inhibitrice de la NSs.** (A) Des cellules HEK 293T ont été transfectées ou non (N.T.) avec 100 ng de pCMV-Luc(Firefly). 24h post-transfection, les cellules ont été infectées ou non avec les virus recombinants rSBV, rSBVΔNSs or rSBVΔNoLS. Les lysats cellulaires ont été collectés 24h p.i. pour mesurer l'activité luciférase. (B) Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec 250 ng de plasmide vide (-) ou un plasmide codant pour 3xFLAG-NSs WT ou le mutant NoLS 1+2, en présence de 100 ng de pCMV-Luc(Firefly). Les lysats cellulaires ont été collectés 24h post-transfection pour mesurer l'activité luciférase. Les différences statistiquement significatives sont représentées sur les graphiques (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , N.S. = non significatif, Student's t test). Adapté de Gouzil et al. (2017).

### 3. Perspectives

Dans les prochaines années, j'envisage de maintenir et développer trois grands axes de recherche :

-**interactomique** autour des orbivirus et d'autres pathogènes (en collaboration)

-**immunité innée** anti-BTV et autres orbivirus

-mécanismes de **restriction/transmission interspécifique** (orbivirus et autres pathogènes)

#### 3.1 Interactomique & orbivirus

Outre le BTV, le genre *Orbivirus* comprend de nombreux autres pathogènes d'intérêt en santé animale tels que l'AHSV, l'EHDV ou l'EEV. L'EHDV a notamment été détecté récemment dans le bassin méditerranéen (Maghreb, Israël...) et constitue une menace réelle d'émergence pour la France métropolitaine. L'AHSV est le pathogène le plus sévère pour les équidés, provoquant des hémorragies massives et étant le plus souvent mortel pour l'animal infecté. L'ensemble de ces pathogènes présente la particularité commune d'être transmis par le même vecteur hématophage appartenant au genre *Culicoides*. Ces arbovirus arborent en revanche un grand panel d'hôtes et de signes cliniques témoignant d'une capacité d'interactions hôtes-virus très variable d'un virus à l'autre malgré leur grande proximité génétique. Afin d'identifier des mécanismes de pathogenèse spécifiques ou partagés, l'objectif ici sera d'identifier par double-hybride en levure de nouvelles interactions pour les protéines codées par ces différents virus. La priorité sera donnée aux protéines/segments déjà reconnus comme jouant un rôle dans les processus de virulence/atténuation ainsi qu'aux protéines non structurales qui interviennent dans la régulation de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Afin de se rapprocher du modèle d'infection naturelle, nous compléterons notre collection de banques d'ADNc en levure avec une banque d'origine équine. Nous utiliserons notamment pour cela les cellules équines ED, qui permettent la réplication d'un grand nombre de pathogènes équins, en collaboration avec le groupe de Sylvie Lecollinet/Cécile Beck au sein de l'UMR et Aymerick Hans (Anses Dozulé). Ce travail sera complété par une approche de co-précipitation d'affinité associée à une identification des partenaires protéiques par

spectrométrie de masse, en particulier pour les protéines générant pas ou peu d'interactants par double-hybride. Les protéines étudiées seront précipitées après surexpression ou au cours de l'infection. Cette stratégie a été récemment employée avec succès pour la protéine NS3 de BTV, permettant, outre l'identification de nouveaux partenaires cellulaires, de prédire des modifications post-traductionnelles pouvant réguler l'expression et l'activité de la protéine virale.

### **3.2 Immunité innée anti-BTV et banque innée**

Le BTV induit efficacement la synthèse des IFN- $\alpha/\beta$  dans de multiples types cellulaires et nous, ainsi que le groupe d'Isabelle Schwartz, avons pu identifier des récepteurs cellulaires impliqués dans cette production. Dans le même temps toutefois, le BTV, comme la plupart des virus, a la capacité de moduler cette voie IFN par plusieurs mécanismes. Ainsi, nous avons montré que la protéine NS3, en interagissant avec l'optineurine, inhibe l'activation de TBK1 et donc la phosphorylation d'IRF3 nécessaire à la synthèse d'IFN- $\beta$  (Chauveau et al., 2013; Pourcelot et al., 2016). Nous souhaitons caractériser cette interaction en identifiant les séquences/domaines essentiels à cette liaison. Cette propriété semble conservée entre différents sérotypes mais des variations sont toutefois observées. Nous souhaitons confirmer ces variations et identifier les résidus critiques pour cet effet. En particulier, la question sera posée de la corrélation de ces variations d'inhibition avec la force de liaison à l'optineurine. Par ailleurs, nous avons montré que le BTV inhibe la voie de réponse IFN en bloquant la translocation de STAT1 et en induisant la dégradation des kinases Jak1 et Tyk2. Toutefois, les déterminants moléculaires viraux et cellulaires restent à identifier. La protéine NS4 induit un blocage transcriptionnel et permet au BTV de maintenir sa réplication dans des cellules traitées par l'IFN, témoignant d'une action de NS4 pour contrer la réponse cellulaire antivirale (Ratinier et al., 2011, 2016). De la même façon, la protéine NS5 récemment identifiée bloque les synthèses cellulaires et pourrait ainsi également limiter les niveaux de réponse antivirale (Stewart et al., 2015). A travers les expériences d'interactomique, nous espérons pouvoir retrouver des interactants permettant d'expliquer l'action de ces protéines virales. Lors de la mise en évidence de la fonction antagoniste de NS3, nous avons aussi observé une inhibition significative avec les protéines VP3 et VP4 (Chauveau et al., 2013). A l'aide d'approches systématique (interactomique) et spécifique (tests rapporteurs avec différents agonistes de

l'IFN), nous espérons apporter des précisions pour comprendre les mécanismes moléculaires d'inhibition de ces protéines. Enfin, ces résultats seront comparés pour d'autres orbivirus d'intérêt tels que l'EHDV, l'AHSV ou l'EEV.

### **3.3 Mécanismes de transmission interspécifique et rôle de l'immunité innée**

La compréhension des mécanismes impliqués dans le franchissement de barrières d'espèces constitue ainsi un enjeu majeur de santé publique en médecine humaine et vétérinaire. Si le changement climatique global, l'intensification de la production alimentaire, l'expansion du commerce international et des voyages sont autant de facteurs anthropiques d'émergence et de diffusion des maladies infectieuses à l'échelle planétaire, l'aptitude d'un virus à s'établir chez un nouvel hôte ou une nouvelle espèce requiert également des adaptations au niveau moléculaire. Cette évolution adaptative doit permettre au virus non seulement de pénétrer et de se répliquer dans un environnement cellulaire et moléculaire inédit, mais également de lutter efficacement contre les défenses de l'hôte nouvellement infecté.

Les orbivirus sont capables d'infecter des hôtes très différents avec un tropisme plus ou moins large. Par exemple, le BTV infecte la plupart des ruminants domestiques et sauvages tandis que l'AHSV cible les équidés uniquement. De plus, si ces deux virus « utilisent » les culicoïdes pour se transmettre d'un animal infecté à l'autre, le sérotype 27 de BTV semble infecter préférentiellement les chèvres par contact direct (Belbis et al., 2017; Zientara et al., 2014). Les mécanismes à l'origine de ces variations de modes de transmission et de restriction d'hôtes restent à ce jour non élucidés. Afin d'identifier de potentielles interactions associées à une infection spécifique chez un ou plusieurs hôtes dédiés, nous effectuerons des cribles double-hybride différentiels dans différentes banques d'espèces d'intérêt. En particulier, nous souhaitons acquérir une banque d'ADNc de chèvre et de cheval pour respectivement rechercher des interactions spécifiques des protéines de BTV27 et d'AHSV avec leurs hôtes naturels. Pour évaluer le potentiel zoonotique de certains orbivirus, nous comparerons également les interactomes de virus inféodés à l'Homme. Les interactions identifiées dans le cadre de ces cribles comparatifs seront retestées avec des orthologues issus d'autres espèces plus ou moins distantes d'un point de vue taxonomique ou épidémiologique pour estimer le degré de conservation et apprécier le risque d'émergence de ces virus.

Le contrôle précoce des infections virales et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace sont très dépendants de la production des interférons de type I (principalement les IFN- $\alpha/\beta$ ) (Randall and Goodbourn, 2008). La liaison de ces cytokines sur leurs récepteurs génère une cascade de signalisation qui induit l'expression d'une multitude de gènes (*IFN-stimulated genes*, ISGs) dont les produits possèdent une activité antivirale et/ou immunomodulatrice. Les virus ont dès lors élaboré une grande variété de contremesures sophistiquées pour réguler l'amplitude de cette réponse cellulaire antivirale (Versteeg and Garcia-Sastre, 2010). La plupart de ces stratégies d'échappement repose sur des interactions directes entre des protéines virales et des protéines de la voie IFN- $\alpha/\beta$ . De façon intéressante, la sélectivité de ces interactions qui interviennent exclusivement dans certaines espèces concourt au phénomène de restriction du tropisme d'hôtes. C'est le cas par exemple de la protéine NS5 du virus de la Dengue qui fixe et dégrade spécifiquement la protéine STAT2 humaine et non sa forme murine, autorisant par ce mécanisme la multiplication virale chez l'homme et non chez la souris (Ashour et al., 2010). L'étude de la variabilité de ces interactions à l'échelle interspécifique s'avère donc primordiale pour appréhender les événements de franchissement de barrières d'espèces et améliorer la prédiction des émergences virales dans la population humaine. L'objectif ici sera d'évaluer l'implication des interactions entre protéines d'orbivirus et protéines du système IFN dans le franchissement de barrières d'espèces en évaluant leur degré de conservation interspécifique. Les interactions identifiées serviront par ailleurs de cibles pour tester l'action de peptides à potentiel antiviral.

Pour ce faire, nous construirons une banque spécifique d'ORFs du système IFN. Une analyse récente de la littérature montre qu'une liste réduite de protéines impliquées dans l'induction (RIG-I, MDA5, MAVS, TRIF, TRAF3, NEMO, TBK1, IKK $\epsilon$ , IRF3, IRF7) ou la réponse à l'IFN (IFNAR1, IFNAR2, JAK1, TYK2, STAT1, STAT2, IRF9) suffit à expliquer près des 2/3 des exemples d'antagonismes viraux faisant intervenir une liaison protéique directe (D. Vitour *et al.*, article en préparation). Chaque ORF virale sera criblée individuellement contre l'une ou l'autre de ces « mini-banques » à l'aide d'une méthode basée sur la reconstitution de l'activité de la luciférase *Gaussia princeps* (*Gaussia princeps* Protein-fragment Complementation Assay, GPCA) (Cassonnet et al., 2011). Pour ce faire, les ORFs virales et les protéines de la voie IFN sont exprimées en fusion avec deux fragments complémentaires non actifs de la luciférase de *G. princeps*, dénommés Gluc1 et Gluc2. Quand une interaction a lieu, ces deux sous domaines se lient et restaurent la fonctionnalité de la luciférase dont l'activité est proportionnelle à l'intensité des interactions. Par cette approche

expérimentale, nous espérons ainsi identifier un grand nombre de cibles cellulaires des antagonistes viraux de la voie IFN.

L'approche GPCA sera également employée pour estimer le degré de conservation des interactions identifiées et préciser leur rôle dans l'adaptation à de nouvelles espèces. Pour ce faire, nous clonerons plusieurs orthologues des interacteurs cellulaires identifiés, en se focalisant dans un premier temps aux hôtes naturels des virus étudiés. Il sera intéressant de comparer des protéines virales homologues entre virus animaux, humains ou zoonotiques pour identifier des déterminants moléculaires viraux impliqués dans le franchissement de la barrière d'espèce. On peut ainsi imaginer qu'un virus zoonotique et/ou infectant de multiples espèces soit capable d'échapper efficacement à la voie IFN et ait ainsi une interaction conservée entre orthologues. Le périmètre des interacteurs issus des hôtes naturels pourra par la suite être élargi à d'autres espèces animales. Cela servira à implémenter une collection de séquences multi-espèces pour étudier la réponse antivirale vis à vis de virus ciblant ces animaux mais aussi pour effectuer de la cartographie comparée d'interactions d'un point de vue évolutif. Ainsi, l'approche matricielle proposée ici pour estimer la conservation d'une stratégie d'échappement viral à travers de multiples espèces contribuera à retracer et/ou prédire des événements d'adaptation pour un tropisme d'hôtes élargi.

Par la suite, nous envisageons d'implémenter cette banque avec des ISGs qui sont conservés entre espèces et joueraient un rôle prépondérant dans la réponse antivirale (Shaw et al., 2017).

Ce programme pourra être étendu à d'autres pathogènes viraux.

Enfin, les interactions identifiées constitueront des cibles antivirales potentielles pour lesquelles nous pourrions tester la capacité de peptides et/ou molécules à casser ces interactions et donc bloquer la réplication virale. Cette stratégie a été récemment employée avec succès avec l'approche GPCA (Dabo et al., 2017).

Ce projet vise à améliorer notre arsenal prédictif et préventif des risques d'émergences des maladies infectieuses. En particulier, ce travail contribuera à une meilleure compréhension du rôle joué par la voie IFN dans le franchissement de la barrière d'espèce et des mécanismes moléculaires associés. En outre, la capacité d'un virus à moduler la réponse IFN peut avoir des conséquences non seulement sur son adaptation à une nouvelle espèce mais aussi en terme de modification de son pouvoir pathogène. A travers la prise en compte de ces différents facteurs, on pourra à termes mieux prédire la virulence d'une souche virale au sein d'une espèce donnée

et mieux pronostiquer la capacité d'une souche à franchir la barrière d'espèce. En identifiant des nouvelles cibles cellulaires impliquées dans la réponse antivirale et potentiellement la restriction d'hôtes, ce projet permettra de définir de nouvelles cibles thérapeutiques antivirales et d'améliorer les stratégies thérapeutiques (abordées ici au travers de l'emploi de peptides autocontraints) et vaccinales pour des virus atténués qui ne bloqueraient plus la réponse IFN. Enfin, les nombreux outils originaux qui seront développés (établissement d'une banque d'ADNc enrichie en protéines de la voie IFN, clonage de multiples orthologues de la voie IFN) seront les atouts forts de ce projet et seront très utiles à la communauté des infectiologistes qui étudient au travers du prisme « One Health » les mécanismes de la réponse innée antivirale et les transmissions virales interspécifiques.



## 4. Bibliographie

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738.

Ashour, J., Morrison, J., Laurent-Rolle, M., Belicha-Villanueva, A., Plumlee, C.R., Bernal-Rubio, D., Williams, K.L., Harris, E., Fernandez-Sesma, A., Schindler, C., et al. (2010). Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication. *Cell Host Microbe* 8, 410–421.

Bansal, O.B., Stokes, A., Bansal, A., Bishop, D., and Roy, P. (1998). Membrane organization of bluetongue virus nonstructural glycoprotein NS3. *J. Virol.* 72, 3362–3369.

Barry, G., Varela, M., Ratniner, M., Blomström, A.-L., Caporale, M., Seehusen, F., Hahn, K., Schnettler, E., Baumgärtner, W., Kohl, A., et al. (2014). NSs protein of Schmallenberg virus counteracts the antiviral response of the cell by inhibiting its transcriptional machinery. *J. Gen. Virol.* 95, 1640–1646.

Beaton, A.R., Rodriguez, J., Reddy, Y.K., and Roy, P. (2002). The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13154–13159.

Belbis, G., Zientara, S., Bréard, E., Sailleau, C., Caignard, G., Vitour, D., and Attoui, H. (2017). Bluetongue Virus: From BTV-1 to BTV-27. *Adv. Virus Res.* 99, 161–197.

Belhouchet, M., Mohd Jaafar, F., Firth, A.E., Grimes, J.M., Mertens, P.P.C., and Attoui, H. (2011). Detection of a fourth orbivirus non-structural protein. *PloS One* 6, e25697.

Bhattacharya, B., and Roy, P. (2008). Bluetongue virus outer capsid protein VP5 interacts with membrane lipid rafts via a SNARE domain. *J. Virol.* 82, 10600–10612.

Bhattacharya, B., Noad, R.J., and Roy, P. (2007). Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virol J* 4, 7.

Blomstrom, A.L., Gu, Q., Barry, G., Wilkie, G., Skelton, J.K., Baird, M., McFarlane, M., Schnettler, E., Elliott, R.M., Palmarini, M., et al. (2015). Transcriptome analysis reveals the host response to Schmallenberg virus in bovine cells and antagonistic effects of the NSs protein. *BMC Genomics* 16, 324.

Breard, E., Hamblin, C., Hammoumi, S., Sailleau, C., Dauphin, G., and Zientara, S. (2004). The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Res Vet Sci* 77, 1–8.

Breard, E., Lara, E., Comtet, L., Viarouge, C., Doceul, V., Desprat, A., Vitour, D., Pozzi, N., Cay, A.B., De Regge, N., et al. (2013). Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *PLoS One*

8, e53446.

Breard, E., Belbis, G., Viarouge, C., Nomikou, K., Haegeman, A., De Clercq, K., Hudelet, P., Hamers, C., Moreau, F., Lili, T., et al. (2015). Evaluation of adaptive immune responses and heterologous protection induced by inactivated bluetongue virus vaccines. *Vaccine* 33, 512–518.

Bréard, E., Sailleau, C., Quenault, H., Lucas, P., Viarouge, C., Touzain, F., Fablet, A., Vitour, D., Attoui, H., Zientara, S., et al. (2016). Complete Genome Sequence of Bluetongue Virus Serotype 8, Which Reemerged in France in August 2015. *Genome Announc.* 4.

Breard, E., Garnier, A., Despres, P., Blaise Boisseau, S., Comtet, L., Viarouge, C., Bakkali-Kassimi, L., Pourquier, P., Hudelet, P., Vitour, D., et al. (2016). Development of a Double-Antigen Microsphere Immunoassay for Simultaneous Group and Serotype Detection of Bluetongue Virus Antibodies. *Transbound. Emerg. Dis.*

Bréard, E., Schulz, C., Sailleau, C., Bernelin-Cottet, C., Viarouge, C., Vitour, D., Guillaume, B., Caignard, G., Gorlier, A., Attoui, H., et al. (2018a). Bluetongue virus serotype 27: Experimental infection of goats, sheep and cattle with three BTV-27 variants reveal atypical characteristics and likely direct contact transmission BTV-27 between goats. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, e251–e263.

Bréard, E., Gorlier, A., Viarouge, C., Donnet, F., Sailleau, C., Schulz, C., Hoffmann, B., Comtet, L., Beer, M., Zientara, S., et al. (2018b). Evaluation of an IGM-specific ELISA for early detection of bluetongue virus infections in domestic ruminants sera. *Transbound. Emerg. Dis.*

Broquet, A.H., Hirata, Y., McAllister, C.S., and Kagnoff, M.F. (2011). RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 1618–1626.

Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., and Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2763–2788.

Cassonnet, P., Rolloy, C., Neveu, G., Vidalain, P.O., Chantier, T., Pellet, J., Jones, L., Muller, M., Demeret, C., Gaud, G., et al. (2011). Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nat Methods* 8, 990–992.

Celma, C.C.P., and Roy, P. (2009). A viral nonstructural protein regulates bluetongue virus trafficking and release. *J. Virol.* 83, 6806–6816.

Celma, C.C.P., and Roy, P. (2011). Interaction of calpactin light chain (S100A10/p11) and a viral NS protein is essential for intracellular trafficking of nonenveloped bluetongue virus. *J. Virol.* 85, 4783–4791.

Celma, C.C., Bhattacharya, B., Eschbaumer, M., Wernike, K., Beer, M., and Roy, P. (2014). Pathogenicity study in sheep using reverse-genetics-based reassortant bluetongue viruses.

Vet. Microbiol. 174, 139–147.

Chauveau, E., Doceul, V., Lara, E., Adam, M., Breard, E., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A., Meyer, G., Schwartz-Cornil, I., et al. (2012). Sensing and control of bluetongue virus infection in epithelial cells via RIG-I and MDA5 helicases. *J. Virol.* 86, 11789–11799.

Chauveau, E., Doceul, V., Lara, E., Breard, E., Sailleau, C., Vidalain, P.-O., Meurs, E.F., Dabo, S., Schwartz-Cornil, I., Zientara, S., et al. (2013). NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *J. Virol.* 87, 8241–8246.

Courtejoie, N., Durand, B., Bournez, L., Gorlier, A., Bréard, E., Sailleau, C., Vitour, D., Zientara, S., Baurier, F., Gourmelen, C., et al. (2018a). Circulation of bluetongue virus 8 in French cattle, before and after the re-emergence in 2015. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 281–284.

Courtejoie, N., Durand, B., Bréard, E., Sailleau, C., Vitour, D., Zientara, S., Gorlier, A., Baurier, F., Gourmelen, C., Benoit, F., et al. (2018b). Serological status for BTV-8 in French cattle prior to the 2015 re-emergence. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, e173–e182.

Courtejoie, N., Salje, H., Durand, B., Zanella, G., and Cauchemez, S. (2018c). Using serological studies to reconstruct the history of bluetongue epidemic in French cattle under successive vaccination campaigns. *Epidemics*.

Dabo, S., Maillard, P., Collados Rodriguez, M., Hansen, M.D., Mazouz, S., Bigot, D.-J., Tible, M., Janvier, G., Helynck, O., Cassonnet, P., et al. (2017). Inhibition of the inflammatory response to stress by targeting interaction between PKR and its cellular activator PACT. *Sci. Rep.* 7, 16129.

DeMaula, C.D., Jutila, M.A., Wilson, D.W., and MacLachlan, N.J. (2001). Infection kinetics, prostacyclin release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonary artery and lung microvascular endothelial cells. *J. Gen. Virol.* 82, 787–794.

DeMaula, C.D., Leutenegger, C.M., Bonneau, K.R., and MacLachlan, N.J. (2002). The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology* 296, 330–337.

Doceul, V., Lara, E., Sailleau, C., Belbis, G., Richardson, J., Breard, E., Viarouge, C., Dominguez, M., Hendrikx, P., Calavas, D., et al. (2013). Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *Vet Res* 44, 31.

Doceul, V., Chauveau, E., Lara, E., Bréard, E., Sailleau, C., Zientara, S., and Vitour, D. (2014). Dual modulation of type I interferon response by bluetongue virus. *J. Virol.* 88, 10792–10802.

Elbers, A.R.W., Backx, A., Ekker, H.M., van der Spek, A.N., and van Rijn, P.A. (2008). Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* 129, 156–162.

Foster, N.M., Luedke, A.J., Parsonson, I.M., and Walton, T.E. (1991). Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains. *Am J Vet Res* 52, 192–196.

Ftaich, N., Ciancea, C., Viarouge, C., Barry, G., Ratniner, M., van Rijn, P.A., Breard, E., Vitour, D., Zientara, S., Palmarini, M., et al. (2015). Turnover Rate of NS3 Proteins Modulates Bluetongue Virus Replication Kinetics in a Host-Specific Manner. *J. Virol.* 89, 10467–10481.

Fulton, R.W., and Pearson, N.J. (1982). Interferon induction in bovine and feline monolayer cultures by four bluetongue virus serotypes. *Can J Comp Med* 46, 100–102.

Goller, K.V., Hoper, D., Schirrmeyer, H., Mettenleiter, T.C., and Beer, M. (2012). Schmallenberg virus as possible ancestor of shamonda virus. *Emerg Infect Dis* 18, 1644–1646.

Gouzil, J., Fablet, A., Lara, E., Caignard, G., Cochet, M., Kundlacz, C., Palmarini, M., Varela, M., Breard, E., Sailleau, C., et al. (2017). Nonstructural Protein NSs of Schmallenberg Virus Is Targeted to the Nucleolus and Induces Nucleolar Disorganization. *J. Virol.* 91.

Guirakhoo, F., Catalan, J.A., and Monath, T.P. (1995). Adaptation of bluetongue virus in mosquito cells results in overexpression of NS3 proteins and release of virus particles. *Arch. Virol.* 140, 967–974.

Han, Z., and Harty, R.N. (2004). The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J. Biol. Chem.* 279, 43092–43097.

Hemati, B., Contreras, V., Urien, C., Bonneau, M., Takamatsu, H.H., Mertens, P.P., Breard, E., Sailleau, C., Zientara, S., and Schwartz-Cornil, I. (2009). Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *J Virol* 83, 8789–8799.

Hoffmann, B., Scheuch, M., Hoper, D., Jungblut, R., Holsteg, M., Schirrmeyer, H., Eschbaumer, M., Goller, K.V., Wernike, K., Fischer, M., et al. (2012). Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis* 18, 469–472.

Huber, J.P., and Farrar, J.D. (2011). Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology* 132, 466–474.

Huismans, H. (1969). Bluetongue virus-induced interferon synthesis. *Onderstepoort J Vet Res* 36, 181–185.

Hyatt, A.D., Gould, A.R., Coupar, B., and Eaton, B.T. (1991). Localization of the non-structural protein NS3 in bluetongue virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 9), 2263–2267.

Jameson, P., and Grossberg, S.E. (1979). Production of interferon by human tumor cell lines. *Arch Virol* 62, 209–219.

Jameson, P., Schoenherr, C.K., and Grossberg, S.E. (1978). Bluetongue virus, an exceptionally

potent interferon inducer in mice. *Infect Immun* 20, 321–323.

Janowicz, A., Caporale, M., Shaw, A., Gulletta, S., Di Gialleonardo, L., Ratnier, M., and Palmarini, M. (2015). Multiple genome segments determine virulence of bluetongue virus serotype 8. *J. Virol.* 89, 5238–5249.

Kraatz, F., Wernike, K., Hechinger, S., König, P., Granzow, H., Reimann, I., and Beer, M. (2015). Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J Virol* 89, 1825–1837.

Laloy, E., Bréard, E., Trapp, S., Pozzi, N., Riou, M., Barc, C., Breton, S., Delaunay, R., Cordonnier, N., Chateau-Joubert, S., et al. (2017). Fetopathic effects of experimental Schmallenberg virus infection in pregnant goats. *Vet. Microbiol.* 211, 141–149.

Lässig, C., and Hopfner, K.-P. (2017). Discrimination of cytosolic self and non-self RNA by RIG-I-like receptors. *J. Biol. Chem.* 292, 9000–9009.

Lavoie, H., Sahmi, M., Maisonneuve, P., Marullo, S.A., Thevakumaran, N., Jin, T., Kurinov, I., Sicheri, F., and Therrien, M. (2018). MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature* 554, 549–553.

Lyons, S.F., Schoub, B.D., Chiu, M.N., and Crespi, M. (1982). Induction of interferon by Sendai virus versus blue tongue virus. *J Interferon Res* 2, 543–547.

Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K., Batten, C., Antony, F., Belaganahalli, M.N., Samy, A.M., Reda, A.A., Al-Rashid, S.A., El Batel, M., et al. (2011). Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 886–889.

MacLachlan, N.J. (2011). Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. *Prev. Vet. Med.* 102, 107–111.

MacLachlan, N.J., and Thompson, J. (1985). Bluetongue virus-induced interferon in cattle. *Am J Vet Res* 46, 1238–1241.

MacLachlan, N.J., Drew, C.P., Darpel, K.E., and Worwa, G. (2009). The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J Comp Pathol* 141, 1–16.

Mattei, F., Schiavoni, G., and Tough, D.F. (2010). Regulation of immune cell homeostasis by type I interferons. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 227–236.

Mellor, P.S., Boorman, J., and Baylis, M. (2000). Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 307–340.

Miller, W.E., and Raab-Traub, N. (1999). The EGFR as a target for viral oncoproteins. *Trends Microbiol.* 7, 453–458.

Mohd Jaafar, F., Belhouchet, M., Vitour, D., Adam, M., Breard, E., Zientara, S., Mertens, P.P.,

and Attoui, H. (2014). Immunisation with bacterial expressed VP2 and VP5 of bluetongue virus (BTV) protect alpha/beta interferon-receptor knock-out (IFNAR(-/-)) mice from homologous lethal challenge. *Vaccine* 32, 4059–4067.

Mortola, E., and Larsen, A. (2010). Bluetongue virus infection: activation of the MAP kinase-dependent pathway is required for apoptosis. *Res. Vet. Sci.* 89, 460–464.

Pleschka, S. (2008). RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biol. Chem.* 389, 1273–1282.

Ponsart, C., Pozzi, N., Bréard, E., Catinot, V., Viard, G., Sailleau, C., Viarouge, C., Gouzil, J., Beer, M., Zientara, S., et al. (2014). Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen. *Vet. Res.* 45, 37.

Pourcelot, M., Zemirli, N., Silva Da Costa, L., Loyant, R., Garcin, D., Vitour, D., Munitic, I., Vazquez, A., and Arnoult, D. (2016). The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing. *BMC Biol.* 14, 69.

Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P.C., and Baylis, M. (2005). Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 171–181.

Randall, R.E., and Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89, 1–47.

Ratinier, M., Caporale, M., Golder, M., Franzoni, G., Allan, K., Nunes, S.F., Armezzani, A., Bayoumy, A., Rixon, F., Shaw, A., et al. (2011). Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS Pathog.* 7, e1002477.

Ratinier, M., Shaw, A.E., Barry, G., Gu, Q., Di Gialleonardo, L., Janowicz, A., Varela, M., Randall, R.E., Caporale, M., and Palmarini, M. (2016). Bluetongue Virus NS4 Protein Is an Interferon Antagonist and a Determinant of Virus Virulence. *J. Virol.* 90, 5427–5439.

Roy, P. (2005). Bluetongue virus proteins and particles and their role in virus entry, assembly, and release. *Adv. Virus Res.* 64, 69–123.

Ruscanu, S., Pascale, F., Bourge, M., Hemati, B., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Bonneau, M., Takamatsu, H., Hope, J., Mertens, P., et al. (2012). The double-stranded RNA bluetongue virus induces type I interferon in plasmacytoid dendritic cells via a MYD88-dependent TLR7/8-independent signaling pathway. *J. Virol.* 86, 5817–5828.

Saegerman, C., Berkvens, D., and Mellor, P.S. (2008). Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 539–544.

Sailleau, C., Breard, E., Viarouge, C., Desprat, A., Doceul, V., Lara, E., Languille, J., Vitour, D., Attoui, H., and Zientara, S. (2013a). Acute Schmallenberg virus infections, France, 2012. *Emerg*

Infect Dis 19, 321–322.

Sailleau, C., Boogaerts, C., Meyrueix, A., Laloy, E., Breard, E., Viarouge, C., Desprat, A., Vitour, D., Doceul, V., Boucher, C., et al. (2013b). Schmallenberg virus infection in dogs, France, 2012. *Emerg Infect Dis* 19, 1896–1898.

Sailleau, C., Viarouge, C., Breard, E., Perrin, J.B., Doceul, V., Vitour, D., and Zientara, S. (2014). Emergence of Bluetongue Virus Serotype 1 in French Corsica Island in September 2013. *Transbound Emerg Dis*.

Sailleau, C., Bréard, E., Viarouge, C., Vitour, D., Romey, A., Garnier, A., Fablet, A., Lowenski, S., Gorna, K., Caignard, G., et al. (2017a). Re-Emergence of Bluetongue Virus Serotype 8 in France, 2015. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 998–1000.

Sailleau, C., Breard, E., Viarouge, C., Gorlier, A., Quenault, H., Hirchaud, E., Touzain, F., Blanchard, Y., Vitour, D., and Zientara, S. (2017b). Complete genome sequence of bluetongue virus serotype 4 that emerged on the French island of Corsica in December 2016. *Transbound. Emerg. Dis*.

Sailleau, C., Breard, E., Viarouge, C., Gorlier, A., Leroux, A., Hirchaud, E., Lucas, P., Blanchard, Y., Vitour, D., Grandcollot-Chabot, M., et al. (2018). Emergence of bluetongue virus serotype 4 in mainland France in November 2017. *Transbound. Emerg. Dis*.

Schulz, C., Bréard, E., Sailleau, C., Jenckel, M., Viarouge, C., Vitour, D., Palmarini, M., Gallois, M., Höper, D., Hoffmann, B., et al. (2016). Bluetongue virus serotype 27: detection and characterization of two novel variants in Corsica, France. *J. Gen. Virol.* 97, 2073–2083.

Schwartz-Cornil, I., Mertens, P.P., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Breard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J., and Zientara, S. (2008). Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res* 39, 46.

Sen, A., Pruijssers, A.J., Dermody, T.S., García-Sastre, A., and Greenberg, H.B. (2011). The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J. Virol.* 85, 3717–3732.

Shaw, A.E., Hughes, J., Gu, Q., Behdenna, A., Singer, J.B., Dennis, T., Orton, R.J., Varela, M., Gifford, R.J., Wilson, S.J., et al. (2017). Fundamental properties of the mammalian innate immune system revealed by multispecies comparison of type I interferon responses. *PLoS Biol.* 15, e2004086.

van Staden, V., and Huismans, H. (1991). A comparison of the genes which encode non-structural protein NS3 of different orbiviruses. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 5), 1073–1079.

Stewart, M., Hardy, A., Barry, G., Pinto, R.M., Caporale, M., Melzi, E., Hughes, J., Taggart, A., Janowicz, A., Varela, M., et al. (2015). Characterization of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus. *J. Gen. Virol.* 96, 3280–3293.

Tabachnick, W.J. (2004). Culicoides and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet. Ital.* **40**, 144–150.

Taylor, W.P., and Mellor, P.S. (1994). The distribution of Akabane virus in the Middle East. *Epidemiol. Infect.* **113**, 175–185.

Umeshappa, C.S., Singh, K.P., Nanjundappa, R.H., and Pandey, A.B. (2010). Apoptosis and immuno-suppression in sheep infected with bluetongue virus serotype-23. *Vet. Microbiol.* **144**, 310–318.

Varela, M., Schnettler, E., Caporale, M., Murgia, C., Barry, G., McFarlane, M., McGregor, E., Piras, I.M., Shaw, A., Lamm, C., et al. (2013). Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathog* **9**, e1003133.

Versteeg, G.A., and Garcia-Sastre, A. (2010). Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr Opin Microbiol* **13**, 508–516.

Viarouge, C., Lancelot, R., Rives, G., Breard, E., Miller, M., Baudrimont, X., Doceul, V., Vitour, D., Zientara, S., and Sailleau, C. (2014). Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. *Vet Microbiol* **174**, 78–85.

Viarouge, C., Breard, E., Zientara, S., Vitour, D., and Sailleau, C. (2015). Duplex Real-Time RT-PCR Assays for the Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus. *PloS One* **10**, e0132540.

Vidal, M., and Fields, S. (2014). The yeast two-hybrid assay: still finding connections after 25 years. *Nat Methods* **11**, 1203–1206.

Vitour, D., Guillotin, J., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A., Wolff, F., Belbis, G., Durand, B., Bakkali-Kassimi, L., Breard, E., et al. (2011). Colostral antibody induced interference of inactivated bluetongue serotype-8 vaccines in calves. *Vet. Res.* **42**, 18.

Vitour, D., Doceul, V., Ruscanu, S., Chauveau, E., Schwartz-Cornil, I., and Zientara, S. (2014). Induction and control of the type I interferon pathway by Bluetongue virus. *Virus Res.* **182**, 59–70.

Walton, T.E. (2004). The history of bluetongue and a current global overview. *Vet. Ital.* **40**, 31–38.

Wirblich, C., Bhattacharya, B., and Roy, P. (2006). Nonstructural protein 3 of bluetongue virus assists virus release by recruiting ESCRT-I protein Tsg101. *J. Virol.* **80**, 460–473.

Wu, X., Chen, S.Y., Iwata, H., Compans, R.W., and Roy, P. (1992). Multiple glycoproteins synthesized by the smallest RNA segment (S10) of bluetongue virus. *J. Virol.* **66**, 7104–7112.



Yanase, T., Maeda, K., Kato, T., Nyuta, S., Kamata, H., Yamakawa, M., and Tsuda, T. (2005). The resurgence of Shamonda virus, an African Simbu group virus of the genus Orthobunyavirus, in Japan. *Arch. Virol.* *150*, 361–369.

Yanase, T., Kato, T., Aizawa, M., Shuto, Y., Shirafuji, H., Yamakawa, M., and Tsuda, T. (2012). Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallerberg virus. *Arch Virol* *157*, 1611–1616.

Zhang, Z., Kim, T., Bao, M., Facchinetti, V., Jung, S.Y., Ghaffari, A.A., Qin, J., Cheng, G., and Liu, Y.-J. (2011). DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells. *Immunity* *34*, 866–878.

Zientara, S., and Sanchez-Vizcaino, J.M. (2013). Control of bluetongue in Europe. *Vet Microbiol* *165*, 33–37.

Zientara, S., Amat, J.P., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A., Vitour, D., and Breard, E. (2012). Difficulties in the interpretation of bluetongue RT-PCR results in France. *Vet Rec* *170*, 599.

Zientara, S., Sailleau, C., Viarouge, C., Hoper, D., Beer, M., Jenckel, M., Hoffmann, B., Romey, A., Bakkali-Kassimi, L., Fablet, A., et al. (2014). Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg Infect Dis* *20*, 2123–2125.