



Cartographie des interactions entre protéines du virus de la fièvre catarrhale ovine et protéines cellulaires chez son hôte mammifère et son hôte vecteur.

Cindy Kundlacz

► To cite this version:

Cindy Kundlacz. Cartographie des interactions entre protéines du virus de la fièvre catarrhale ovine et protéines cellulaires chez son hôte mammifère et son hôte vecteur.. Sciences du Vivant [q-bio]. Paris Est Créteil, 2018. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-04494030⟩

HAL Id: tel-04494030

<https://hal.science/tel-04494030v1>

Submitted on 7 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

École Doctorale
Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Université Paris-Est
Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

Cindy KUNDLACZ

Le mardi **18 décembre 2018** à Maisons-Alfort

**Cartographie des interactions virus-hôtes
pour le virus de la fièvre catarrhale ovine et
mise en évidence d'une nouvelle fonction
portée par la protéine NS3**

Directeur de thèse : **Dr. Stéphan ZIENTARA**

Composition du Jury :

Dr. Dorothee MISSÉ, Directeur de recherche, IRD de Montpellier

Dr. Frédéric ARNAUD, Chargé de recherche, INRA de Lyon

Dr. Myriam ERMONVAL, Chargée de recherche, Institut Pasteur de Paris

Dr. Lionel TAFFOREAU, Maître de conférences, Université de Mons

Dr. Ali AMARA, Directeur de recherche, INSERM de Paris

Dr. Damien VITOUR, Directeur de projet de recherche, LSA de Maisons-Alfort

Dr. Grégory CAIGNARD, Ingénieur de recherche, LSA de Maisons-Alfort

Dr. Stéphan ZIENTARA, Directeur de recherche, LSA de Maisons-Alfort

Présidente du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

UMR 1161 Virologie ANSES-INRA-ENVA, Laboratoire de Santé Animale

14 rue Pierre et Marie Curie, 94704 Maisons-Alfort

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier chaleureusement les membres de mon jury de thèse qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail : **Dorothée Missé** et **Frédéric Arnaud** d'avoir accepté de consacrer de leur temps à la lecture de mon manuscrit. Je remercie également **Myriam Ermonval**, **Lionel Tafforeau** et **Ali Amara** qui ont accepté d'être examinateurs le jour de ma soutenance de thèse.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse : **Maxime Ratinier** et **Pierre-Olivier Vidalain**. Vos précieux conseils pendant nos trois réunions m'ont beaucoup appris et aidé pour l'avancée du projet. Merci pour votre regard bienveillant sur le déroulement de ma thèse. Un grand merci à vous d'avoir accepté d'être dans mes personnes référentes pour mes recherches de post-doc.

Je remercie **Stéphan Zientara** qui a accepté de diriger ma thèse et qui m'a chaleureusement accueillie au sein de l'UMR de viro. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour l'organisation du congrès Young Epizone, c'était vraiment une superbe expérience, merci pour cette très grande opportunité. Merci également pour ton soutien le jour de ma première présentation orale en anglais au congrès BT/AHS workshop. Tu es un super directeur de thèse !

Un énorme merci à mon encadrant, **Damien Vitour** de m'avoir accueillie lors de mon stage de master 2 et de m'avoir donné l'opportunité et la chance de réaliser ma thèse au sein de son équipe avec un projet que j'ai adoré. Merci pour tous les échanges que l'on a pu avoir et pour toute la confiance que tu m'as toujours témoignée. Tu as toujours su trouver les bons mots pour me pousser à me surpasser. Merci pour tes nombreux conseils et encouragements ces derniers mois.

Je remercie infiniment **Grégory Caignard**, mon encadrant depuis le stage de master 2. Merci pour ta patience, ta confiance et l'autonomie que tu m'as laissée. C'est grâce à toi que je suis devenue la scientifique que je suis à ce jour. Tu as été très présent pour moi ces derniers mois, toute ton aide et tout ton soutien m'ont été très précieux, un énorme merci ! Tu es et resteras un exemple pour moi, ne change pas, tu es un super encadrant ! Merci également d'avoir pris la suite de mes manip pour que je puisse me consacrer pleinement à l'écriture du manuscrit.

A tous les membres du groupe **I5** : merci pour toute votre aide, pour tout votre soutien et pour toutes vos attentions. L'esprit positif qui règne au sein de l'équipe rend le travail quotidien très agréable. J'ai passé 3 années magnifiques en votre compagnie. Vous allez beaucoup me manquer. J'espère que nos chemins se recroiseront.

Aurore mon appui quotidien, mon repère les jours de stress. Merci pour tout !! Ton aide, tes attentions, ta présence quotidienne pour me remotiver et me rebooster quand ça n'allait pas fort. Merci pour toutes ces GST que tu as faites et rerefaites, sans toi la partie carto ne serait pas là où elle en est aujourd'hui.

Rayane, tu as su être très présente ces mois où mon stress était à son max et tu as toujours eu les bons mots pour me rassurer ! Merci pour ta bonne humeur quotidienne et ta précieuse aide ces derniers mois.

Marie, merci pour tes conseils pour la rédaction du manuscrit et pour ton aide. Un grand merci pour les résultats de spectro qui nous ont énormément aidés !

A tous les membres de l'UMR, un grand merci à vous tous, j'ai passé trois années magnifiques en votre compagnie

Je tiens à remercier tout particulièrement **Houssam**, pour tes précieux conseils et ta disponibilité à mes moindres questions. Merci d'avoir assisté à mes comités de thèse et pour les outils que tu nous as mis à disposition. Merci également à **Baptiste** et **Fao** pour votre gentillesse. **Marine**, merci pour toutes ces soirées, ces discussions et ce super week-end. Quelle équipe de bras cassés à notre sortie canoë, ma jambe en a encore les marques. **Marie Pellerin**, merci pour ta bonne humeur, ton soutien et ces nombreuses discussions en pièce Western ! **Lauren**, un grand merci pour ton aide au sein du laboratoire et pour ta bienveillance. Merci pour nos discussions et ta motivation pendant les pauses café pour essayer de me déstresser. **Steeve**, merci pour toutes tes histoires pendant les pauses déjeuners, de très bons fous rires ! **Sandrine**, mon binôme d'astreinte pendant une petite période. Je m'excuse encore pour la fois où il y a eu un congélateur en alarme et que j'étais en train de dormir comme une grosse marmotte. Merci pour tous tes précieux conseils que tu m'as donné après toutes mes présentations. **Yves** et **Léa** mes deux compères Alsaciens ! Que la force soit avec vous pour continuer à défendre notre superbe région !! Merci pour toutes les discussions que l'on a pu échanger autour de notre belle région. **Jennifer**, merci pour tes encouragements et conseils pour la recherche d'un post-doc. **Sophie**, merci pour ta patience lorsque l'on faisait des réunions dans le bureau du chef et pour nos échanges. Merci à **Fleur**, **Rose**, **Virginie**, **Gaëlle**, **Manon Delaplace**, **Anne**, **François**, **Marielle**, **Cécile**, **Muriel** et **Georges** pour nos discussions entre deux manipulations ou aux pauses déjeuners. Merci à **Sylvie**, **Nicole** et **Bernard** pour vos mots d'encouragement lorsque l'on se croisait sur le campus pendant la période de rédaction. Un très grand merci à **Françoise** et **Bahia** pour toute votre aide administrative et pour toutes nos discussions. **Bahia**, merci d'avoir tout mis en œuvre pour obtenir la salle Curie pour le jour J.

Une pensée toute particulière aux occupants du bureau des étudiants, merci à vous pour la bonne ambiance qui y règne ! **Manon Lemasson**, merci d'avoir toujours été là pour me soutenir et pour m'écouter. **Sergiu**, toujours un petit mot d'encouragement, merci à toi. Fais attention à ta santé, plus de déménagement maintenant ! **Manon Broutin**, mon ancienne voisine de bureau, merci pour tes précieux conseils pour la mise en page du manuscrit. Bon courage à vous trois pour la suite de vos thèses ! Sans oublier, **Mazigh**, à deux jours d'intervalle nous allons soutenir notre thèse, que la force soit avec nous !

Sans oublier toutes les personnes du côté Bachelard qui m'ont chaleureusement accueillie pendant toute la période de rédaction du manuscrit. Merci à vous tous pour votre soutien quotidien et pour toutes vos petites attentions. Vous m'avez habituée à un super confort, le retour à la réalité risque d'être compliqué !

Sandra, un peu comme une troisième encadrante pour moi. Merci de m'avoir organisé le bureau, tu m'as permis d'avoir un environnement de travail parfait pour que la rédaction se passe le mieux possible. Un grand merci pour toute ton aide et pour toute ta bienveillance. **Corinne** et **Manu** merci pour votre disponibilité, votre aide et pour vos visites quasi quotidiennes pour voir si tout se passait bien pendant la rédaction, si j'étais toujours en vie. **Cyril** et **Aurore Romey** ou les super déménageurs. Le nouvel aménagement du bureau est vraiment top, ça va être difficile de repartir. Merci pour votre bonne humeur quotidienne. **Rémi**, mon nouveau collègue de bureau, je te confie les plantes, ne fais pas comme moi, ne les noie pas. Pour finir je tiens également à remercier **Labib**, **Eve**, **Anthony**, **Aurélia**, **Dominique** et **Kamila** pour votre très bon accueil et pour nos discussions. **Kami**, ta main verte me fascinera toujours ! J'ai essayé du mieux que j'ai pu de prendre soin de tes plantes.

Une pensée pour les anciens membres de l'UMR :

Eugénie, merci pour toutes nos discussions et pour ton soutien. Ton départ a fait un grand vide dans le bureau. Merci pour toutes ces très bonnes soirées à boire des « acide passion », on ne changera jamais nos bonnes habitudes. **Annabelle**, un grand merci pour ta joie de vivre, tes blagues et ta bonne humeur quotidienne. **Julie**, merci pour tes nombreux conseils pendant le début de ma thèse et de m'avoir fait découvrir Young Epizone. **Manon**, **Mathilde**, **Camille** et **Margot** merci pour votre bonne humeur pendant votre stage de M2 et pour votre soutien pendant cette dernière année de thèse. Une pensée plus particulière à **Margot**, ça a été un grand plaisir pour moi te t'encadrer pendant ton stage de M1, ça a été une très belle expérience. Merci pour l'aide que tu m'as apporté. Je te souhaite une très belle réussite pendant ta thèse !

A mes amis du Master, avec qui, on a passé deux très belles années. Une pensée plus particulière à **Cindy** sans qui je n'aurai pas eu les contacts pour intégrer une équipe si formidable. Bon courage à toi pour cette dernière ligne droite !

A **Lina**, ma chérie ! Malgré cette distance qui nous sépare, j'ai toujours pu compter sur toi comme dans nos années lycées, merci pour tout. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse. Tu me manques terriblement ! Je t'aime.

A **Sophie**, ma petite bichette ! Depuis ton départ de Paris nous n'avons plus autant l'occasion de nous voir, mais je sais que je peux toujours compter sur toi, merci ! Promis je passerai te rendre visite dans le Sud !

Une dernière pensée aux amis du lycée et de la fac qui sont encore présents à ce jour et qui sont derrière moi pour m'encourager, merci à vous !

A ma famille sans qui je ne serai pas là, je vous aime !

A **mes parents**, qui ont toujours cru en moi et sans qui je ne serai pas ce que je suis devenue aujourd'hui. Pour vos encouragements quotidiens, de m'épauler et me soutenir dans tout ce que j'ai entrepris jusqu'ici, je vous remercie. Merci à mon grand-frère, **Lionel**, mon protecteur, qui a toujours un œil bienveillant sur moi. Je suis très fière de toi, mon modèle de réussite depuis toute petite. Je te souhaite tout ce qu'il y a de meilleur pour l'ouverture de ton cabinet de kiné, mais je ne me fais pas de souci, tu vas cartonner ! A mes **grands-parents**, **oncles** et **tantes** merci à vous ! Pensée particulière à mon **papi Filou** qui a toujours cru en moi depuis toute petite et qui est si fier de moi. Tu l'avais dit un jour : *«vous verrez, elle va tous nous surprendre !»*.

A **Christine** et **Christian**, merci de m'avoir accueillie dans votre famille.

Et mon dernier remerciement ira à **Quentin**, et pas le moindre, avec qui je partage ma vie depuis plus de 3 ans. Merci pour ton soutien permanent, ton aide quotidienne et ta patience tout au long de ces 3 années. Ça n'a pas toujours été facile mais j'ai toujours pu me reposer sur toi. Je t'aime !

J'en oublie sûrement, mais du fond du cœur, merci à vous !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLES	17
LISTE DES ANNEXES.....	17
RESUME.....	19
ABSTRACT.....	20
AVANT-PROPOS.....	21
INTRODUCTION	25
I. Le virus de la Fièvre Catarrhale Ovine	27
A. Situation épidémiologique de la FCO	27
1. Historique et répartition mondiale de la FCO	27
2. Épidémiologie de la FCO en Europe	29
• De 1998 à 2005 : multiples émergences dans le bassin méditerranéen	29
• De 2006 à 2010 : Épizootie majeure par le BTV-8	30
3. Épidémiologie de la FCO en France depuis 2013	32
• Émergence du BTV-1 en Corse en 2013	32
• Déclaration de cas de BTV-4 en France depuis 2014	32
• Réémergence du BTV-8 en France en 2015	33
4. Détection de nouveaux sérotypes de BTV considérés comme « atypiques »	33
B. Transmission et vecteur	34
C. Pathogenèse	36
D. Le virus.....	37
1. Classification	37
2. Génome du BTV	38
3. La particule virale	39
a) Structure et protéines	39
• Les protéines de la capside externe : VP2 et VP5.....	39
• Les protéines majeures de la capside interne : VP3 et VP7.....	40
• Les protéines mineures de la capside interne : VP1, VP4 et VP6	40
b) Les protéines non structurales.....	42
• La protéine NS1	43
• La protéine NS2	43
• La protéine NS4	44
• La protéine NS5	45
4. Cycle de réplication	46
E. Réponse immunitaire et vaccins	49
1. Réponse immunitaire innée contre le BTV.....	49
a) La voie des interférons de type I (IFN-I)	49
b) Activation de la voie IFN-I dans le contexte BTV	50
c) Le BTV évolue pour échapper à la réponse innée	51
• Blocage de la synthèse d'IFN-I.....	51
• Blocage de la réponse d'IFN-I	51
2. Réponse immunitaire humorale	52

3.	Réponse immunitaire cellulaire	52
4.	Vaccinologie	52
F.	La protéine non structurale NS3	54
1.	Caractéristiques générales et localisations	55
2.	Fonctions associées à la protéine NS3	56
a)	NS3 est impliquée dans le transport et la libération des particules virales	56
•	Libération par lyse cellulaire.....	56
•	Libération par bourgeonnement cellulaire.....	57
b)	La pathogénicité du BTV est liée à sa protéine NS3	60
c)	Impact de NS3 sur la voie des interférons de type I.....	61
II.	Les voies de signalisation MAP-Kinases	62
A.	Généralité sur les voies	62
1.	Les voies de signalisation MAPK « classiques ».....	62
•	La voie ERK1/2 ou MAPK/ERK	63
•	La voie p38	63
•	La voie JNK.....	63
•	La voie ERK5	64
2.	Les voies de signalisation MAPK « atypiques »	64
•	La voie ERK3/4.....	65
•	La voie ERK7/8.....	65
•	La voie NLK	65
B.	La voie de signalisation MAPK/ERK (ou ERK1/2)	66
1.	Mécanisme d'activation de la voie.....	67
•	Le récepteur à l'EGF : l'EGFR	67
•	GRB2 : la protéine adaptatrice de l'EGFR.....	67
•	La protéine RAS	68
•	Les protéines MAP3K : ARAF, BRAF, CRAF	68
•	Les protéines MAP2K : MEK1, MEK2.....	69
•	Les protéines MAPK : ERK1, ERK2	69
2.	Compartimentation de la voie MAPK/ERK	70
a)	A la membrane plasmique : importance de la protéine KSR.....	71
b)	A l'appareil de Golgi : importance de la protéine Sef.....	71
c)	Aux endosomes : importance de la protéine MP1.....	72
3.	Répercussion de l'activation de la voie MAPK/ERK sur la cellule.....	73
•	Régulations du cycle cellulaire	74
•	Traduction des protéines cellulaires	75
C.	La protéine kinase BRAF	76
•	Structure de BRAF	76
•	Cycle d'activation de BRAF	77
•	Activation de BRAF par KSR.....	80
D.	La voie de signalisation MAPK/ERK et les virus	81
1.	Les virus oncogènes	81
2.	Les virus non oncogènes	82
E.	Les inhibiteurs de la voie MAPK/ERK.....	82
	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	85
	RESULTATS.....	89
	CHAPITRE 1 : CARTOGRAPHIE DES INTERACTIONS BTV-HOTES	91
I.	INTRODUCTION	93
II.	MATERIELS ET METHODES	93
A.	Le double-hybride en levure.....	93

1.	Principe	93
2.	Clonage des ORFs viraux	96
a)	Stratégie de clonage Gateway®	96
b)	Constructions plasmidiques	97
3.	Clonage des banques d'ADNc issues de cellules MDBK et KC	98
4.	Criblages des ORFs du BTV contre deux banques d'ADNc spécifiques par la technique du double-hybride en levure	98
a)	Transformation des levures avec les ORFs du BTV et les banques d'ADNc.....	99
b)	Cribles double-hybride en levure	100
c)	Identification des proies cellulaires obtenues à la suite des cribles.....	101
B.	Validations biochimiques des interactions	101
1.	Co-purification d'affinité par la technique de GST <i>pull-down</i>	101
2.	Préparation des échantillons protéiques (lysats totaux) et <i>Western-Blot</i>	103
3.	Anticorps	103
C.	Validation fonctionnelle : exemple de l'autophagie.....	104
1.	Infections virales	104
2.	Transfections	105
III.	RESULTATS	105
A.	Recherche de nouveaux partenaires pour les ORFs du BTV-8 et -27 par la technique du double-hybride en levure	105
1.	Transformation des levures Y187 avec les banques d'ADNc (MDBK et KC).....	105
2.	Transformation des levures Y2H Gold avec les appâts viraux et test d'auto-activation	106
3.	Résultats des cribles double-hybride pour le BTV-8 et -27 et ses hôtes	107
4.	Identification des interacteurs pour le BTV-8 et -27	108
5.	Cartes d'interactions pour le BTV-8 et -27	109
6.	Les principaux processus biologiques ciblés par le BTV	111
B.	Validations biochimiques des interactions	113
C.	Validation fonctionnelle d'un interacteur : exemple de l'autophagie.....	120
1.	L'autophagie.....	121
2.	Impact du BTV sur la voie de l'autophagie	121
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	124
CHAPITRE 2 : IMPACT DU BTV SUR LA VOIE DE SIGNALISATION MAPK/ERK.....	131	
I.	INTRODUCTION	133
II.	MATERIELS ET METHODES.....	133
A.	Clonage et plasmides.....	133
B.	Cellules	134
C.	Infections virales.....	134
D.	Transfections	134
E.	Tests rapporteurs	135
F.	Préparation des échantillons protéiques (lysats totaux) et <i>Western-Blot</i>	136
G.	Co-purification d'affinité par GST <i>pull-down</i>	136
H.	Spectrométrie de masse.....	136
I.	Microscopie à fluorescence.....	137
J.	Titrages	138
K.	Extraction d'ARN et RT-qPCR.....	139
L.	Réactifs	139
1.	Anticorps	139
2.	Inhibiteurs	140
III.	RESULTATS	140

A.	Effet du BTV sur la voie de signalisation MAPK/ERK	140
B.	Impact des protéines virales sur la voie de signalisation MAPK/ERK	142
C.	Etude de la phosphorylation des protéines ERK1/2 et eIF4E en contexte infectieux et NS3	143
D.	Comparaison entre les sérotypes de BTV	144
E.	Comparaison entre orbivirus	145
F.	Impact de différents fragments et mutant de NS3 sur la voie MAPK/ERK	146
G.	Niveau d'action de NS3 sur la voie MAPK/ERK	148
H.	Identification du compartiment cellulaire à l'origine de l'activation de la voie MAPK/ERK par NS3-BTV	150
I.	Identification de BRAF comme interacteur de NS3-BTV	151
J.	L'interaction NS3-BRAF est responsable de l'activation de la voie MAPK/ERK	154
K.	Lien entre l'activation de la voie MAPK/ERK et l'inhibition de la réponse IFN- α/β ?	157
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	159
	CONCLUSION GENERALE	167
	BIBLIOGRAPHIE	171
	ANNEXES	193

LISTE DES ABREVIATIONS

-H	Milieu synthétique complet dépourvu d'histidine
-L	Milieu synthétique complet dépourvu de leucine
-W	Milieu synthétique complet dépourvu de tryptophane
3-AT	3-amino-1,2,4-triazole

A

A	Alanine
AATF	<i>Apoptosis-Antagonizing Transcription Factor</i>
ADNc	ADN complémentaire
AHSV	<i>African Horse Sickness Virus</i>
annexine II/p36	Chaîne lourde de la calpactine
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
ARN db	ARN double brin
ARN sb	ARN simple brin
ARNm	ARN messenger
ATF-1	<i>Activating Transcription Factor 1</i>
ATG	<i>Autophagy-related Gene</i>
ATP	Adénosine triphosphate
att	<i>Site-specific attachmment</i>

B

Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BECN1	Bécline1
BRS	<i>BRAF-Specific</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
BSR	<i>Baby hamster kidneys cells</i>
BTV	<i>Bluetongue Virus</i>

C

C-ter	région carboxy-terminal d'une protéine
C1QBP/p32	<i>Complement C1q Binding Protein</i>
Ca ²⁺	Calcium
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
CASP8AP2	<i>CASP8-Associated Protein 2</i>
CCHCR1	<i>Coiled-Coil alpha-Helical Rod protein 1</i>
cDCs	Cellules dendritiques conventionnelles
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CHIKV	<i>Chikungunya Virus</i>
CK2	Caséine Kinase 2
CMV	<i>Cytomégaloovirus</i>
complexe MICOS	<i>Mitochondrial inner membrane complex</i>
CRD	<i>Cysteine-Rich Domain</i>

CREB3	<i>Cyclic AMP-Responsive Element-Binding</i>
D	
DAG	<i>Diacylglycérol</i>
DENV	<i>Dengue Virus</i>
DISA	<i>Disabled Infectious Single Animal</i>
DISC	<i>Disabled Infectious Single Cycle</i>
DIVA	<i>Differentiation between Infected and Vaccinated Animals</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Diméthylsulfoxyde</i>
DO	<i>Densité Optique</i>

E

E	<i>Acide glutamique</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
EC	<i>Extracellulaire</i>
ECP	<i>Effet cytopathogène</i>
EEF1A1	<i>Elongation Factor 1-Alpha 1</i>
eEF2	<i>Eucaryotic Elongation Factor 2</i>
EEV	<i>Equine Encephalosis Virus</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EHDV	<i>Epizootic Hemorrhagic Disease Virus</i>
eIF4	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 4</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulate Kinase</i>
ERK5/BMK1	<i>Big MAP Kinase-1</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
EXOSC9	<i>Exosome Component 9</i>

F

FCO	<i>Fièvre Catarrhale Ovine</i>
FL	<i>Full Length</i>

G

G	<i>Glycine</i>
GABARAPL	<i>γ-Aminobutyric Acid Receptor-Associated Protein</i>
GADPH	<i>Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase</i>
Gal4-AD	<i>Domaine d'activation de Gal4</i>
Gal4-DB	<i>Domaine de liaison à l'ADN de Gal4</i>
GDP	<i>Guanosine Diphosphate</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor/Facteurs d'échange guanidine</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GRB2	<i>Growth factor Receptor Bound protein 2</i>
GST	<i>Gluthatione-S-Transferase</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>

H

H	Histidine
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>
HIPK2	<i>Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2</i>
HIS3	Histidine 3
HNRNPK	<i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K</i>
HPIV-3	<i>Human Parainfluenza Virus type 3</i>
HRAS	<i>Harvey RAS</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HT-GPCA	<i>High-Throughput Gaussia Princeps protein Complementation Assay</i>

I

IFN	Interféron
IFNAR	<i>IFN-Alpha Receptor</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
IKK ϵ	<i>Inductible IκB Kinase</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IMMT	<i>MICOS complex subunit MIC60</i>
IQGAP1	<i>IQ motif-containing GTPase Activating Protein 1</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISGs	<i>Interferon-Stimulated Genes</i>
ISRE	<i>IFN-Stimulated Response Element</i>

J

JAK1	<i>Janus tyrosine Kinase 1</i>
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal Kinase</i>

K

KC	Cellules d'origine culicoïde sonorensis
kDa	kiloDalton
KIF12	<i>Kinesin-like protein</i>
KRAS	<i>Kirsten RAS</i>
KSR	<i>Kinase Suppressor of RAS</i>

L

L	Leucine
LC3A/B/C	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>
LTC	Lymphocytes T Cytotoxiques

M

MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPKK/2K	<i>MAPK Kinase</i>
MAPKKK/3K	<i>MAPK Kinase Kinase</i>

MAVS	<i>Mitochondrial Antiviral Signaling</i>
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
METTL26	<i>Methyltransferase-like 26</i>
MNK1/2	<i>Mitogen-activated protein kinases-interacting kinases 1 and 2</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection/Multiplicité d'infection</i>
MP1	<i>MEK Partner 1</i>
MSK1/2	<i>Mitogen- and Stress-activated Kinase 1 and 2</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response 88</i>

N

N-ter	Région amino-terminale d'une protéine
NEED4	<i>Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal/Séquence d'exclusion cellulaire</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NLK	<i>Nemo-like kinase</i>
NoLS	Signal de localisation nucléolaire
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS</i>
NTR	<i>N-terminal regulatory regions</i>
NTS	Séquence de translocation nucléaire

O

O18787	<i>Elongation factor 1 alpha (bovin)</i>
OIE	Office Internationale des Epizooties
OPTN	Optineurine
ORF	<i>Open Reading Frame/phase ouverte de lecture</i>

P

P	Proline
p11	Chaîne légère de la calpactine
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PAWR	<i>PRKC Apoptosis WT1 Regulator protein</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pDCs	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor/Facteur de croissance dérivé des plaquettes</i>
PEG	Polyéthylène Glycol
Pen-strep	Pénicilline-streptomycine
PFA	Paraformaldéhyde
PIAS1	<i>E3 SUMO-protein ligase</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PKR	<i>Protein Kinase RNA-activated</i>
PLCy	Phospholipase C gamma
PP2A	<i>Protein Phosphatase 2A</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>

PTKR *Protein-Tyrosine Kinase Receptor/Récepteur à protéine tyrosine kinase*

Q

qPCR *PCR en temps réel*

R

RasGRP1 *Ras Guanyl Releasing Protein 1*

RBD *RAS Binding Domain*

RdRp *ARN polymérase ARN dépendante*

RGDV *Rice Gall Dwarf virus*

RIG-I *Retinoic acid-inductible gene I*

RLRs *RIG-I Like Receptors*

RLU *Relative Luciferase Unit*

rNTP *Nucléoside triphosphate*

RPL31 *60S Ribosomal Protein L31*

RPL8 *60S Ribosomal P L8*

RPS *40S Ribosomal Protein S*

RSK *Ribosomal s6 Kinase*

RT *Transcription inverse*

RT-qPCR *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*

S

S *Sérine*

SAPK/JNK *Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun NH2-terminal Kinase*

SH *Src-Homology*

siARN *Small Interfering ARN/ARN interférant*

SIKE1 *Suppressor of IKBKE 1*

SOS *Sun-Of-Sevenless*

STAT *Signal Transducer and Activator of Transcription protein*

SUMO *Small Ubiquitin-like Modifier*

SVF *Sérum de Veau Fœtal*

T

T *Thréonine*

TACC1 *Transforming Acidic coiled-coil-containing protein 1*

TBK1 *TANK Binding Kinase 1*

TBS *Tris-Buffered Saline*

TCF/LEF *T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor*

TCID *Tissue Culture Infectious Dose*

TLR *Toll-Like Receptors*

TM ou T *Domaine transmembranaire*

TNF *Tumor Necrosis Factor*

TRAIL *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*

Tsg101 *Tumor Susceptibility Gene 101*

TYK2 *Tyrosine Kinase 2*

U

UBE2I *Ubiquitin Conjugating enzyme E2 I*

UVs

Ultraviolets

V

VIBs

Corps d'inclusion viraux

VLP

Virus-Like Particles/pseudos particules virales

W

W

Tryptophane

WNV

West Nile Virus

WT

Wild Type/sauvage

WTAP

Pre-mRNA-splicing regulator

Y

Y

Tyrosine

Y2H

Yeast two-hybrid system/Double-hybride en levure

YFV

Yellow Fever Virus

YPD

Yeast extract Petptone Dextrose

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition mondiale des 27 sérotypes décrits de BTV.....	28
Figure 2 : Voies d'introduction des différents sérotypes de BTV en Europe de 1998 à 2006.	29
Figure 3 : Localisation des foyers de BTV-8 et de BTV-1 en France en novembre 2008.	31
Figure 4 : Moucheron culicoïdes hématophages.....	34
Figure 5 : Mode de transmission du BTV.....	35
Figure 6 : Exemples de symptômes observés chez les ovins et les bovins lors de l'infection par le BTV.....	37
Figure 7 : Organisation et fonctions des protéines structurales et du génome du BTV.....	42
Figure 8 : Image des tubules de NS1 par cryoélectromicroscopie.	43
Figure 9 : Immunofluorescence permettant de visualiser les corps d'inclusion viraux (VIBs) formés par NS2.	44
Figure 10 : Cycle de réplication du BTV.....	48
Figure 11 : Impact du BTV et de sa protéine NS3 sur la voie des interférons de type I (IFN-I).	51
Figure 12 : Représentation schématique de la protéine NS3 et ses interactions avec la calpactine, Tsg101, VP2 et VP5.	55
Figure 13 : Mutation ALL131-133EEE dans le domaine transmembranaire1 (TM1) de NS3.....	57
Figure 14 : Schéma représentant les mécanismes utilisés par NS3 pour faciliter la libération des particules de BTV.	60
Figure 15 : La voie de signalisation MAPK/ERK.	70
Figure 16 : Les trois principales protéines d'échafaudage impliquées dans la compartimentation de la voie MAPK/ERK : KSR, Sef et MP1.	73
Figure 17 : Les différents substrats (cytoplasmiques et nucléaires) que les kinases ERK1/2 activent suite à l'induction de la voie de signalisation MAPK/ERK.	76
Figure 18 : Représentation schématique de la protéine kinase BRAF.....	77
Figure 19 : Cycle d'activation de BRAF.	79
Figure 20 : Exemple du modèle d'activation de BRAF par KSR1 qui implique MEK1.	80
Figure 21 : Les principaux inhibiteurs de la voie MAPK/ERK.	83
Figure 22 : Crible double-hybride en levure.....	95
Figure 23 : Clonage par recombinaison Gateway®.....	97
Figure 24 : Validation des interactions par co-purification d'affinité (GST pull-down).	102
Figure 25 : Transformation des levures avec des banques codant les proies et des appâts viraux.	106
Figure 26 : Cartographie des interactions entre les protéines virales du BTV-8 et du BTV-27 et les protéines cellulaires bovines.	110
Figure 27 : Cartographie des interactions entre les protéines virales du BTV-8 et du BTV-27 et les protéines cellulaires culicoïdes.....	112
Figure 28 : Validation biochimique des interacteurs de la protéine NS3 : IMMT, Tsg101 et CREB3.....	115
Figure 29 : Validation biochimique des interacteurs de la protéine NS4 : KIF12, AATF, SIKE1 et CCHCR1.	117
Figure 30 : Validation biochimique de l'interacteur WTAP de la protéine NS4.....	118
Figure 31 : Validation biochimique de l'interacteur BECN1 de la protéine NS4.....	119
Figure 32 : Validation biochimique de l'interacteur C1QBP des protéines NS4 et NS5.	120
Figure 33 : Induction de la voie de l'autophagie dans des cellules infectées par le BTV.....	123
Figure 34 : Le BTV active la voie de signalisation MAPK/ERK.	141
Figure 35 : Les protéines NS3/NS3A activent la voie de signalisation MAPK/ERK.	143
Figure 36 : Niveaux de phosphorylation des protéines ERK1/2 et eIF4E en contexte NS3 et infectieux.	144
Figure 37 : Activation de la voie MAPK/ERK par la protéine NS3 : comparaison entre sérotypes de BTV et entre différents orbivirus.....	145
Figure 38 : Effet de différents fragments et mutant de NS3 sur la voie MAPK/ERK.	147
Figure 39 : L'U0126 empêche l'activation de la voie MAPK/ERK par la protéine NS3 et inhibe la réplication virale.....	149
Figure 40 : Lien entre compartimentation cellulaire et activation de la voie MAPK/ERK par NS3.....	151
Figure 41 : Interaction de la protéine cellulaire BRAF avec NS3.	153
Figure 42 : Etude de la localisation de la protéine BRAF et NS3.	154
Figure 43 : Impact de l'inhibiteur GDC-0879 et de l'absence de BRAF sur l'activation de la voie MAPK/ERK en contexte infectieux et NS3.	156

Figure 44 : Etude du potentiel lien entre activation de la voie MAPK/ERK et inhibition de la voie des IFN- α/β .	158
Figure 45 : Représentation schématique hypothétique du mode d'activation de BRAF par NS3 responsable de l'activation de la voie MAPK/ERK.	163

LISTE DES TABLES

Tableau 1 : Ensemble des protéines codées par les 10 segments d'ARN double brin du BTV-8 et leurs fonctions.	38
Tableau 2 : Caractéristiques principales des 4 voies de signalisation MAPK dites « classiques ».	64
Tableau 3 : Caractéristiques principales des 3 voies de signalisation MAPK dites « atypiques ».	66
Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés pour les <i>Western-Blot</i>	104
Tableau 5 : Nombre de clones repiqués pour chaque appâts par banque.	108
Tableau 6 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescences.	138

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Exemples de mécanismes de modulations viro-induites de la voie MAPK/ERK (liste non exhaustive).	195
Annexe 2 : Oligonucléotides utilisés pour réaliser les clonages, mutagénèses et qPCRs.	197
Annexe 3 : Liste des interacteurs identifiés par double-hybride à partir de la banque MDBK pour les protéines codées par le BTV-8.	201
Annexe 4 : Liste des interacteurs identifiés par double-hybride à partir de la banque MDBK pour les protéines codées par le BTV-27.	203
Annexe 5 : Liste des interacteurs identifiés par double-hybride à partir de la banque KC pour les protéines codées par le BTV-8.	205
Annexe 6 : Liste des interacteurs identifiés par double-hybride à partir de la banque KC pour les protéines codées par le BTV-27.	206
Annexe 7 : Séquences peptidiques identifiées pour BRAF par spectrométrie de masse.	207
Annexe 8 : Publication à laquelle j'ai été associée durant mon doctorat.	208

RESUME

Le virus de la fièvre catarrhale ovine (*Bluetongue virus*, BTV) est l'agent étiologique de la maladie du même nom, une arbovirose non contagieuse transmise aux ruminants domestiques et sauvages par l'intermédiaire de morsures de moucheron hémato-phages du genre *Culicoides*. Il existe actuellement 27 sérotypes décrits de BTV à travers le monde qui se distinguent par les pathologies qu'ils induisent et leur capacité à infecter et se propager chez leur(s) hôte(s) mammifère(s). Le premier objectif de mon projet de thèse visait à identifier les interactions cellulaires spécifiques des sérotypes 8 et 27 pour identifier des facteurs de pathogénicité/virulence et/ou de franchissement de barrière d'espèces. Pour atteindre cet objectif, l'ensemble des protéines virales du BTV a été criblé par la méthode du double-hybride en levure contre deux banques d'ADN complémentaires, l'une d'origine bovine et l'autre d'origine culicoïde. A l'issue de 70 cribles, une centaine de nouvelles interactions virus-hôtes a été mise en évidence et révèle un enrichissement pour quatre processus cellulaires : l'épissage des ARNm, les ribosomes, la SUMOylation et l'apoptose. Cette étude nous a ainsi permis de réaliser le premier interactome pour le BTV qui se poursuit au travers de multiples validations biochimiques et fonctionnelles des interactions identifiées. En parallèle de ce travail de protéomique, le second objectif de mon projet de thèse a été de déterminer l'impact du BTV sur la voie MAPK/ERK, une voie cellulaire essentielle à la prolifération et différenciation cellulaire et classiquement modulée lors d'infections virales. En plus de son rôle antagoniste sur la voie des interférons de type I, nous avons démontré la capacité de la protéine NS3 de BTV à activer la voie MAPK/ERK. En effet, nous avons démontré que NS3 a la capacité d'augmenter le niveau de phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 mais également du facteur de traduction eIF4E. Cette fonction, qui semble être spécifique au BTV par rapport aux autres orbivirus, implique l'interaction de NS3 avec la protéine cellulaire BRAF, une protéine MAP3 kinase jouant un rôle majeur dans l'activation de la voie MAPK/ERK. L'activation de cette voie par NS3 pourrait être un mécanisme de détournement de la traduction cellulaire au profit de celle du virus mais aussi constituer un élément de réponse pour expliquer l'hyper-inflammation observée dans le cas d'une infection par ce virus.

MOTS CLES : virus de la fièvre catarrhale ovine, interactions virus-hôtes, protéine NS3, voie MAPK/ERK

ABSTRACT

Bluetongue virus (BTV) is the etiological agent of the bluetongue (BT) disease, a non-contagious arbovirus that affects a wide range of wild and domestic ruminants. It is transmitted by blood-feeding midges of the genus *Culicoides*. There are currently 27 serotypes described of BTV in the world that are distinguished by their differences in term of pathology/virulence and their capacity to infect and disseminate in their mammalian host(s). The first objective of my thesis project was to identify specific cellular interactions of serotype 8 and 27 to reveal new factors of pathogenicity/virulence and/or cross species barrier. To reach this goal, all the proteins encoded by BTV were used as baits to screen, by a high-throughput yeast two-hybrid (Y2H) approach, two complementary DNA libraries originating from hosts naturally infected by BTV : *Culicoides* and cattle. Therefore, 70 screens were performed to identify a hundred of new virus-host interactions and reveal an enrichment for four cellular processes : mRNA splicing, ribosomes, SUMOylation and apoptosis. This study allowed us to build the first interactome of BTV which continues through multiple biochemical and functional validations of the identified interactions. In parallel to this proteomics work, my second objective was to determine the impact of BTV on the MAPK/ERK pathway, a cellular pathway essential for cell proliferation and differentiation usually modulated during viral infections. In addition to its antagonist role on the type I interferon pathway, we have demonstrated the ability of BTV-NS3 to activate the MAPK/ERK pathway. Indeed, we have demonstrated that NS3 has the ability to increase the level of phosphorylation of ERK1/2 protein and the eIF4E translation factor. This function, which seems to be specific to BTV compared to other orbiviruses, involves the interaction of NS3 with BRAF cellular protein, a MAP3 kinase protein that plays a major role in the regulation of the MAPK/ERK pathway. These results could provide a better understanding of the molecular basis underlying the hijacking of the translation machinery to support virus replication but also constitute a hypothesis to explain the hyperinflammation observed in the BTV infection context.

KEYWORDS : bluetongue virus, virus-host interactions, NS3 protein, MAPK/ERK signaling pathway



AVANT-PROPOS

Un virus est un parasite intracellulaire obligatoire, il dépend donc totalement de la cellule qu'il infecte pour survivre et se répliquer. Au fil du temps, les virus ont développé des stratégies pour pirater des fonctions cellulaires à leur propre profit afin de mener à bien leur cycle viral mais également pour échapper à la défense immunitaire de l'hôte. La grande majorité des fonctions cellulaires détournées par les virus résulte d'interactions entre protéines virales et protéines cellulaires [1]. Pour ce faire, l'identification des interactions virus-hôtes permet de discerner des réseaux de protéines cellulaires et de fonctions associées essentielles dans le cycle de réplication du virus [2]. Une comparaison des interactomes obtenus entre protéines humaines et protéines virales a déjà révélé des mécanismes cellulaires piratés [1] par les virus comme par exemple:

- le contrôle du cycle cellulaire,
- le détournement des facteurs de transcription cellulaire au profit de la transcription des gènes viraux,
- le ciblage des protéines cellulaires qui régulent le cycle de l'apoptose,
- le piratage de la machinerie de transport nucléaire afin de favoriser le transport des protéines virales dans le noyau.

Suite à la description en 1980 des premières interactions entre protéines virales et protéines cellulaires, les méthodologies utilisées ont évolué et sont maintenant adaptées à des études à grande échelle afin d'identifier un plus grand nombre d'interaction protéines-protéines [2]. Il existe quatre grandes approches sans a priori pour identifier ce type d'interactions. Le double-hybride en levure et la co-purification d'affinité couplée à la spectrométrie de masse sont actuellement les deux méthodes les plus fréquemment utilisées. La HT-GPCA (*High-Throughput Gaussia Princeps Protein Complementation Assay*) et la "protein array" ou "protein chips" (réseau de protéines ou puces à protéines) sont quant à elles deux approches développées plus récemment [2]. Le double-hybride en levure (ou *yeast two-hybrid system*, Y2H) permet de détecter des interactions directes. A l'inverse, la co-purification d'affinité couplée à la spectrométrie de masse permet d'identifier des complexes de protéines [2]. La HT-GPCA développée par le groupe de Yves Jacob à l'institut Pasteur de Paris, permet d'étudier la dynamique des interactions protéines-protéines en cellules de mammifère, elle est basée sur la reconstitution de l'activité enzymatique de la *Gaussia* luciférase [3]. Les puces à protéines permettent quant à elles de fixer des milliers de

protéines avec une haute densité sur une surface solide. Si une protéine d'intérêt se lie à sa cible, l'interaction peut alors être détectée par des marquages fluorescents ou photochimiques [4].

La richesse des données obtenues pour les interactions virus-hôtes au niveau protéique a permis de générer des interactomes complets pour plusieurs virus d'intérêt en santé humaine : le virus de la grippe (*Influenza virus*), le virus de l'hépatite C (HCV pour *Hepatitis C Virus*), le virus de la dengue (DENV pour *Dengue Virus*), le virus d'Epstein-Barr (EBV pour *Epstein-Barr Virus*) et le virus chikungunya (CHIKV pour *Chikungunya Virus*). Cependant, aucun interactome n'a encore été réalisé pour un virus épizootique.



INTRODUCTION

I. Le virus de la Fièvre Catarrhale Ovine

Le virus de la Fièvre Catarrhale Ovine (FCO) ou *Bluetongue virus* (BTV) en anglais, appartient à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus*. Ce virus est l'agent étiologique de la fièvre catarrhale du mouton, une maladie non contagieuse transmise par un moucheron du genre *Culicoides*. Ce virus infecte tout type de ruminants et provoque des signes cliniques très variés chez ceux-ci. Dans les cas les plus graves, la FCO peut provoquer des fièvres hémorragiques chez les ovins (et de la mortalité). Il existe actuellement 27 sérotypes caractérisés de ce virus, plus quatre autres sérotypes récemment identifiés mais pas encore officiellement classifiés. La répartition du virus a longtemps été restreinte aux régions tropicales et subtropicales jusqu'à son émergence récente en Europe. La FCO est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'Office International des Epizootie (OIE) depuis les années 1960, puisqu'elle est considérée comme une maladie à propagation rapide et ayant un impact sanitaire sur les ruminants domestiques. Lors d'une épizootie, des mesures sanitaires peuvent être mises en place afin d'éradiquer ou de circonscrire la propagation du virus. Elles sont basées principalement sur la vaccination des troupeaux et le contrôle des déplacements d'animaux.

A. Situation épidémiologique de la FCO

1. Historique et répartition mondiale de la FCO

Les premières observations de FCO ont eu lieu en Afrique du Sud à la fin du 18^{ème} siècle chez des animaux domestiques (bovins et ovins) et sauvages (cerf de Virginie, élan et antilope d'Amérique). En 1902, Hutcheon décrit plus précisément la maladie qui portait à cette époque le nom de "*Malarial Catarrhal Fever*" [5]. Une étude plus détaillée de celle-ci est parue en 1905 (par Spreull) qui décrivait que les signes cliniques les plus observés étaient la fièvre, des lésions aux niveaux de la bouche et des pattes, et la présence d'une cyanose de la langue chez les animaux infectés. A la même époque le terme "*Bluetongue*" est apparu provenant de la traduction du terme hollandais "*Blaauwtong*" pour bleuissement de la langue [6]. En 1906, Theiler découvrit la nature infectieuse de la maladie en observant que

l'agent pathogène était un virus filtrable [7]. Trente ans plus tard (1940), le virus fut cultivé sur œufs embryonnés, la transmission vectorielle par le culicoïde découverte, ainsi que la déclinaison du virus sous différents sérotypes [8].

Jusqu'en 1940, la FCO était considérée comme une maladie exclusivement africaine jusqu'à son apparition confirmée à Chypre en 1943, en Israël en 1951 [9,10], aux États-Unis en 1952 [8,11], en Inde en 1954 [12] et en Australie en 1975 [13]. En 1956, une épizootie majeure a débuté au Portugal puis s'est étendue jusqu'en Espagne provoquant une forte mortalité de la population ovine [14]. Jusqu'en 1998, la limite supérieure de la FCO était comprise entre 40° et 50° de latitude Nord et la limite méridionale entre 20° et 30° de latitude Sud se cantonnant aux régions tropicales et subtropicales et coïncidant avec certaines espèces de culicoïdes vectrices de la maladie [8]. Le virus possède à ce jour une répartition quasi-mondiale (Figure 1). Quatre hypothèses non exclusives prédominent pour expliquer l'extension de l'aire géographique de la FCO : **1)** le réchauffement climatique entraînant de nouvelles aires de répartition du vecteur *Culicoides imicola* dont l'origine est africano-asiatique [15], **2)** l'adaptation du virus à de nouvelles espèces de culicoïdes compétentes [16], **3)** un transport passif du vecteur par les vents et **4)** la mondialisation entraînant des transports massifs de ruminants domestiques ou sauvages non contrôlés potentiellement virémiques [8].

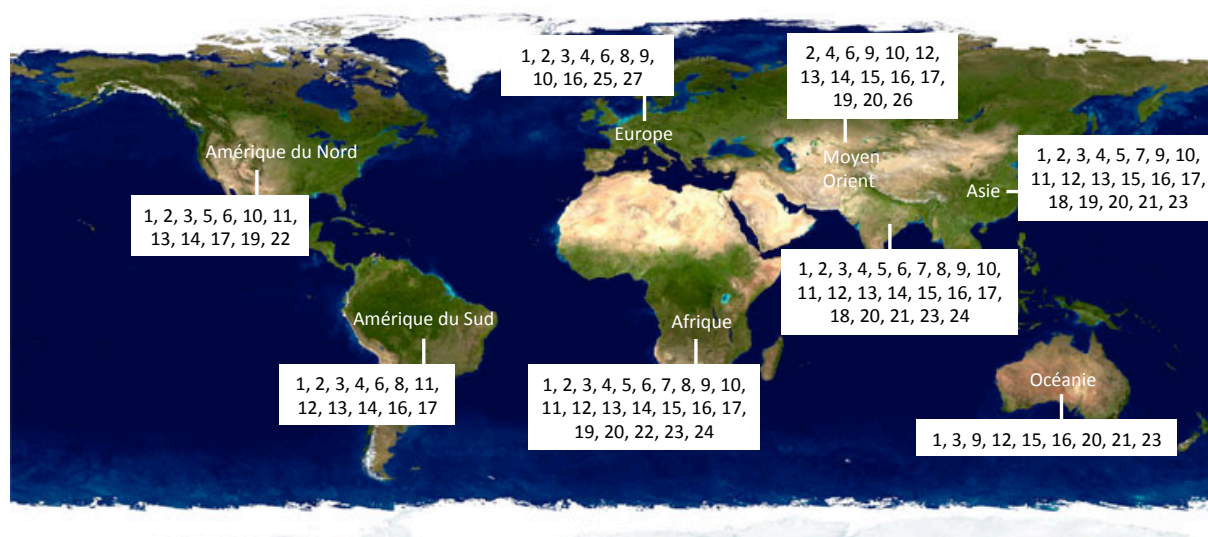


Figure 1 : Répartition mondiale des 27 sérotypes décrits de BTB.

Carte adaptée de <http://www.carte-du-monde.net/carte-zoom-209-carte-monde-satellite-europe.html>

2. Épidémiologie de la FCO en Europe

- **De 1998 à 2005 : multiples émergences dans le bassin méditerranéen**

Avant 1998, la FCO était considérée en Europe comme une maladie exotique. Seule une épizootie en Espagne et au Portugal en 1956 et des cas en Grèce en 1979 avaient été rapportés.

A partir de 1998, et jusqu'en 2005, au moins six souches provenant de cinq sérotypes de BTV (sérotypes 1, 2, 4, 9 et 16) différents ont été présentes dans le bassin méditerranéen [17]. En 1998, le BTV-9 provenant de l'Eurasie a été détecté en Grèce [18] puis s'est répandu dans les Balkans et en Bulgarie [9,19]. En 1999, le BTV-16 provenant du Moyen-Orient s'est introduit dans le bassin méditerranéen en Grèce, en Turquie et en Israël [18]. Durant la même année, le BTV-4 a également été détecté en Grèce [10,18]. En 2000, une souche de BTV-2 circulant en Afrique du Nord s'est propagée dans les îles Baléares, en Corse, dans le Sud de l'Italie, en Tunisie, en Algérie et en Grèce [18,20]. En 2001, une souche de BTV-1 asiatique s'introduit en Europe de nouveau par la Grèce. De 2003 à 2005, une souche de BTV-4 en provenance d'Afrique du Nord s'est étendue en Espagne, au Portugal et en Corse [9,10,19,21]. En résumé, l'origine du BTV dans le bassin méditerranéen est double : certaines souches proviennent d'une introduction depuis l'Asie (sérotypes 1, 4, 9 et 16) et d'autres depuis le Maghreb (sérotypes 1, 2 et 4) (Figure 2) [20].

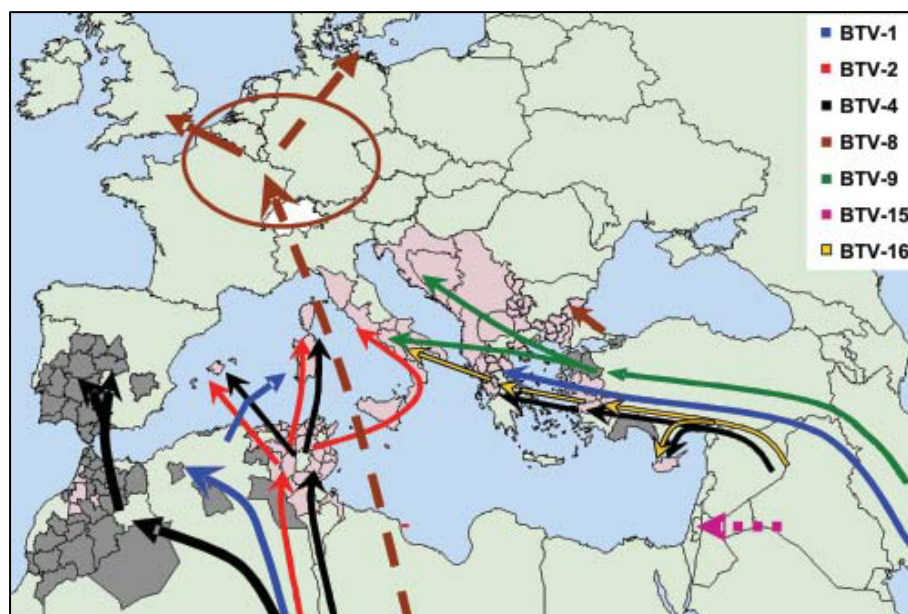


Figure 2 : Voies d'introduction des différents sérotypes de BTV en Europe de 1998 à 2006.

Extrait de Saegerman, C. & al, *Emerging Infect. Dis.*, 2008 [17].

- **De 2006 à 2010 : Épidémiologie majeure par le BTV-8**

En août 2006, les premiers cas de BTV-8 ont été identifiés aux Pays-Bas (456 foyers) puis le virus s'est propagé en Belgique (695 foyers), en Allemagne (885 foyers), dans le Nord de la France (6 foyers) et dans le grand-duché du Luxembourg (5 foyers) [10]. La saison hivernale ne permit pas l'éradication attendue de la maladie. Ainsi, le virus ré-émergea en 2007, au moment de la reprise de l'activité vectorielle, dans tous les pays touchés en 2006 et se propagea dans de nouveaux pays (Danemark, Suisse, République tchèque, Royaume Uni) en touchant près de 60 000 exploitations [10]. En 2008, une importante campagne de vaccination a débuté dans les zones infectées de l'ensemble des pays européens concernés, permettant de réduire fortement le nombre de foyers et ainsi de contenir la propagation [10]. Cependant, comme cette campagne ne ciblait pas les régions à risque, la France a observé une augmentation du nombre de cas (24 000 élevages infectés) [10]. Une année supplémentaire (2009) a été nécessaire pour observer une diminution drastique du nombre de cas de BTV-8 en France (83 foyers).

La souche de BTV-8 qui a sévi en Europe du Nord durant cette épidémiologie s'est révélée virulente chez les ovins mais également de manière inattendue chez les bovins [22-25]. Elle possédait également la capacité d'infecter des espèces de ruminants sauvages [26]. Les pathologies associées à cette souche ont également été inhabituelles. En effet, le BTV-8 a causé divers troubles de la reproduction tels qu'une stérilité transitoire entraînant une diminution de la fertilité, des avortements et une augmentation de l'intervalle entre vêlages (mise-bas), mais également des retards de croissance et des altérations de la qualité de la laine [8]. De plus, cette souche pouvait être transmise des femelles gestantes à leur fœtus par un passage transplacentaire du virus, fait qui n'était alors décrit que pour des souches de laboratoire, atténuées, et utilisées comme souches vaccinales [27,28]. D'autre part, cette souche s'est propagée pour la première fois par l'intermédiaire d'espèces de culicoides (*C. obsoletus* et *C. dewulfi*) différentes de l'espèce principale vectrice de la maladie : *C. imicola*, présente en Europe du Sud et en Afrique [29].

Le mode d'introduction de ce sérotype en Europe n'est pas connu. Cependant, il pourrait provenir de l'importation de ruminants ou de culicoides infectés mais aussi de produits de ruminants infectés (semences, embryons) [30,31]. De plus, des alignements de séquence ont révélé une similitude étroite avec une souche de BTV-8 isolée en Afrique subsaharienne [32].

En 2007, une souche de BTV-1 originaire d'Afrique du Nord (touchée en 2006) s'est répandue de l'Espagne au Portugal et jusque dans le Sud de la France [10]. Elle s'est ensuite propagée jusqu'en Bretagne en 2008. Cette année-là, plus de 6 000 exploitations touchées par le BTV-1 ont été recensées en Europe. Cinq mois après l'apparition de ce sérotype en Espagne, un vaccin inactivé pour le BTV-1 fut disponible commercialement. Cependant, la présence simultanée du BTV-1 et -8 dans le Sud-Ouest de la France en 2008 engendra des co-infections (Figure 3). Les épizooties de BTV-8 et de BTV-1 ont eu des impacts considérables sur le bétail et ont engendré des pertes économiques ainsi que des coûts importants dus aux mesures sanitaires mises en place (contrôle des mouvements et vaccination des ruminants domestiques). A la suite des campagnes de vaccination obligatoire, la majorité des pays Européens retrouva leur statut indemne de BTV en 2012.

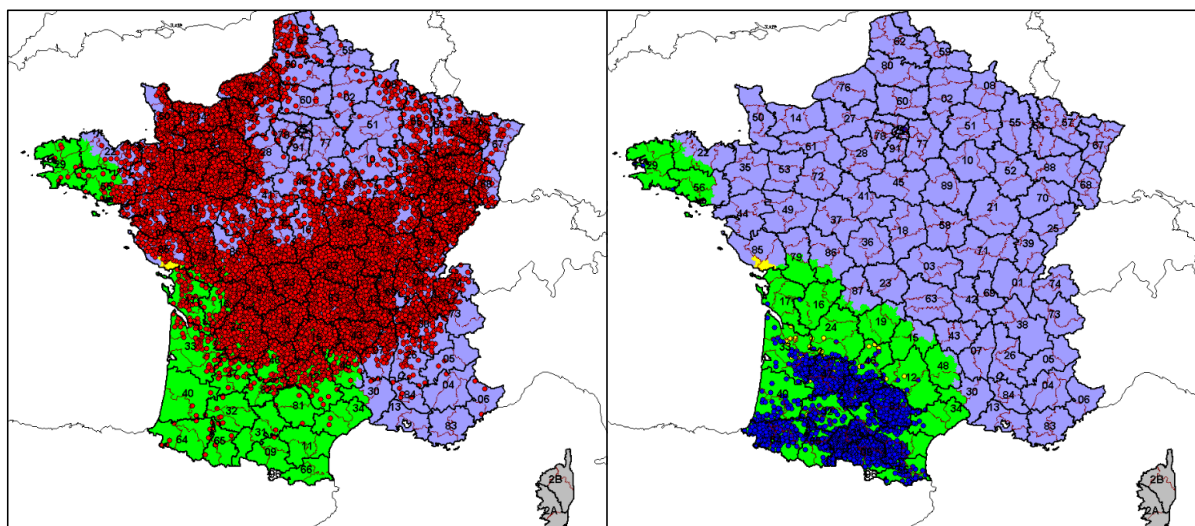


Figure 3 : Localisation des foyers de BTV-8 et de BTV-1 en France en novembre 2008.

Les points rouges représentent les foyers de BTV-8, les points bleus les foyers de BTV-1 et les points jaunes les foyers de BTV-1/BTV-8. La zone bleue représente la zone réglementée pour le sérotype 8 et la zone verte la zone réglementée pour les sérotypes 1 et 8. Source : DGAL

En octobre 2008, le laboratoire national de référence néerlandais (*CVI Lelystad*) a confirmé la présence du BTV-6 en Europe occidentale. Celui-ci fut également détecté en Allemagne et dans les régions limitrophes des Pays-Bas. Il semblerait que cette souche soit apparentée à la souche vaccinale vivante produite en Afrique du Sud contre ce sérotype et dont l'origine proviendrait de l'utilisation illégale d'un vaccin vivant [8,10]. En 2009, une souche de BTV-11 a été détectée en Belgique et semblerait également apparentée à la souche vaccinale vivante correspondante [10]. Il est à noter que dans cette région ont émergé 3 souches du

BTV (sérotypes 6, 8 et 11), désignant ainsi un point d'introduction, privilégié mais d'origine indéterminée, pour le BTV.

3. Épidémiologie de la FCO en France depuis 2013

- **Émergence du BTV-1 en Corse en 2013**

En 2013, le BTV-1 a été détecté en Corse, après avoir circulé en Sardaigne, sur des ovins présentant des signes cliniques évocateurs de la maladie. Après vaccination des ruminants domestiques pendant l'hiver, ce sérotype ne sera plus détecté sur l'île après 2014.

- **Déclaration de cas de BTV-4 en France depuis 2014**

Durant l'année 2014, des épizooties attribuées au BTV-4 ont eu lieu en Grèce et se sont propagées dans le Sud-Est de l'Europe [33]. Par la suite, cette souche de BTV-4 a été détectée en Hongrie, en Sardaigne et le 1^{er} décembre 2016 en Corse [34,35]. Des analyses phylogénétiques du génome d'isolats corses ont montré une identité de 99,85 % avec le BTV-4 qui circulait en Hongrie en 2014 [35] et en Italie en 2015 (données du LNR).

En 2017, le BTV-4 fut déclaré dans de nombreux pays européens : l'Autriche, la Bosnie-Herzégovine, la Croatie, l'Espagne, le Portugal, l'Italie, la Serbie, la Suisse et la Turquie. Il est probable que l'origine de ces différentes épizooties proviennent de différentes souches de BTV-4 avec des origines (africaine, Est de l'Europe, péninsule Arabique) et des caractéristiques (pathogénicité, virulence) différentes. Courant juin de la même année, le BTV-4 a ré-émergé sur toute la Corse engendrant une maladie sévère chez les ovins non vaccinés. Les bovins furent également infectés mais ne montrèrent aucun signe clinique. La campagne de vaccination obligatoire qui a débuté au printemps 2016 visant tous les ruminants domestiques sensibles a été maintenue afin d'éradiquer le BTV-4 et d'éviter une propagation en dehors de la Corse [35].

Le 6 novembre 2017, un cas de FCO sérotype 4 a été détecté dans un élevage de Haute-Savoie [36]. Plusieurs foyers ont depuis été rapportés dans d'autres départements et le virus semble aujourd'hui toujours circuler activement.

- **Réémergence du BTV-8 en France en 2015**

Trois ans après l'éradication du BTV-8 en France, un nouveau foyer de FCO (sérotypage 8) a été détecté en septembre 2015 dans un élevage bovin-ovin de l'Allier [37]. Des signes cliniques évocateurs de la FCO (augmentation de la température, problèmes respiratoires et œdème de la face) ont été décelés chez un bélier de cinq ans le 21 août 2015 [37]. Le séquençage complet du génome a permis de déterminer qu'il était identique à 99.9 % à la souche de BTV-8 qui circulait en France entre 2006 et 2010, suggérant une réémergence de la souche [37]. Il est probable que l'origine de cette réémergence soit due à une circulation à très bas bruit de ce sérotypage depuis sa première émergence en 2006 [38]. Aujourd'hui, près de 3000 cas de BTV-8 ont été rapportés en France, avec cependant, très peu de signes cliniques observés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les animaux aient développé une immunité partielle due à la primo-infection de 2006 mais également grâce à la campagne de vaccination obligatoire mise en place jusqu'en 2012 [39].

4. Détection de nouveaux sérotypes de BTV considérés comme « atypiques »

Des sérotypes supplémentaires de BTV ont été découverts et caractérisés depuis 2008. Ces nouveaux sérotypes sont considérés comme « atypiques » en raison de leurs caractéristiques phénotypiques *in vitro* et *in vivo* qui les distinguent des sérotypes classiques. Le BTV-25 a été découvert chez des caprins en Suisse et fut provisoirement appelé Toggenburg [40]. Il est asymptomatique chez les caprins mais peut provoquer expérimentalement des signes cliniques bénins chez les ovins, tel qu'un gonflement des ganglions lymphatiques ou une conjonctivite [41]. Les mêmes observations ont été faites pour le BTV-26 découvert simultanément chez des caprins et des ovins au Koweït [42,43]. Expérimentalement, il possède un mode de transmission direct, par contact entre les chèvres [44]. Le BTV-25 ne possède pas ce mode de transmission par contact direct et aucune infection productive n'a, pour le moment, été démontrée pour ce sérotypage [41]. En 2014, un nouveau sérotypage, le BTV-27, a été mis en évidence uniquement chez des chèvres en Corse [45]. Une enquête de prévalence a permis de distinguer trois variants distincts au sein de ce nouveau sérotypage (v01-03), sans signe clinique associé [46]. Sur le terrain, le

variant v01 est retrouvé majoritairement en comparaison avec les deux autres. Au niveau expérimental, les trois variants sont parfaitement cultivables en cellules de mammifères mais ne se répliquent pas dans les cellules d'insecte culicoïde (*KC cells*) [47]. Des infections expérimentales sur caprins ont révélé que le variant v02 pourrait être transmis par contact direct entre caprins, comme le BTV-26. Il semblerait donc que le vecteur culicoïde ne soit pas nécessaire à la transmission de ce sérotype. Les phénotypes observés semblent révéler que les trois variants du BTV-27 pourraient posséder des caractéristiques proches des sérotypes 25 et 26 [47].

Quatre autres sérotypes considérés comme « atypiques » ont été découverts dernièrement. En Israël, le BTV-28 a été détecté et isolé à partir d'une préparation vaccinale [48], le BTV-29 a quant à lui été isolé à partir d'un alpaga en Afrique du Sud [49], le BTV-30 a été découvert chez des caprins en Sardaigne [50] et le BTV-31 a été isolé chez des caprins (et détecté chez des ovins) en Chine [51].

B. Transmission et vecteur

A l'exception de quelques sérotypes décrits plus haut (BTV-26 et 27), le BTV est principalement transmis par l'intermédiaire de moucheron hémato-phages du genre *Culicoides* (Figure 4). Les culicoïdes sont de petits diptères nématocères de 1 à 4 mm de longueur appartenant à la famille des *Ceratopogonidae* [8]. Ils possèdent une activité essentiellement nocturne. Actuellement, il existe 1254 espèces de culicoïdes qui sont réparties dans le monde et près de 80 espèces sont signalées en France [8]. Sur la totalité des espèces de culicoïdes répertoriées, seules 17 espèces sont incriminées dans la transmission du BTV [52]. Les espèces compétentes varient selon les régions du monde : *C. imicola* est l'espèce majoritairement présente dans le Sud de l'Europe, l'Afrique, l'Asie du Sud-Est et le Moyen-Orient tandis que *C. sonorensis* est l'espèce majoritaire en Amérique du Nord et *C. brevitarsis* en Australie [8,16,53].



Figure 4 : Moucheron culicoïdes hémato-phages.

Extrait de Wilson, A. & al, *PLoS Biol*, 2008 [54].

La transmission du virus s'effectue lors d'un repas sanguin, tous les 3 ou 4 jours environ, qui permet à la femelle d'obtenir des protéines pour la production des œufs [55]. Une fois dans l'intestin du vecteur, le virus infecte les cellules de la paroi postérieure du tube digestif où il se réplique. Puis, il est libéré dans la cavité corporelle de l'insecte et se propage aux glandes salivaires où se produit un second cycle de répllication. Le virus est alors disponible dans la salive pour être transmis lors d'un prochain repas sanguin [15]. C'est à cette étape que le vecteur est considéré comme infectieux [54]. Le temps nécessaire à la propagation asymptomatique du virus dans le vecteur varie de quelques jours à plusieurs semaines en fonction de la température et de la souche virale [56,57]. De plus, la probabilité de transmission du virus d'un vecteur infecté à un hôte sensible par piqûre est proche de 100 % (Figure 5) [58].

La distribution de la FCO est corrélée aux régions où les culicoïdes sont présents et la capacité vectorielle (capacité du vecteur à transmettre l'infection) est limitée à la période d'activité des moucherons adultes, qui dépend de la température atmosphérique. La température optimale pour la répllication du virus au sein des culicoïdes est de 25 °C [57,59]. En hiver, les populations de culicoïdes adultes infectés peuvent survivre et maintenir leur activité en s'abritant à l'intérieur des abris/bâtiments d'élevage [60].

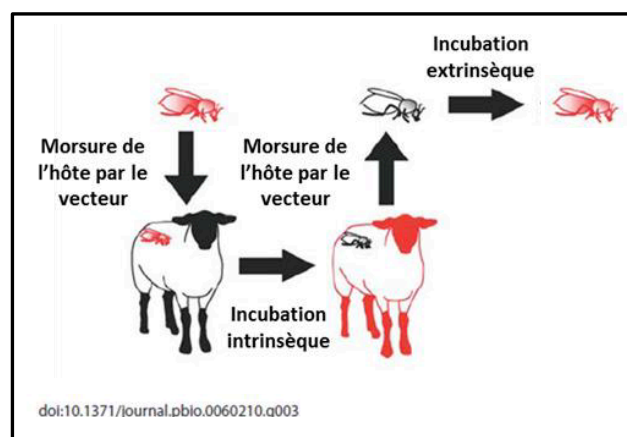


Figure 5 : Mode de transmission du BTV.

Adapté de Wilson, A. & al, *PLoS Biol*, 2008 [54].

En dehors d'une transmission vectorielle majoritaire, une transmission vénérienne (via le sperme durant la virémie), par transfert d'embryons (en période de virémie, le virus est présent dans l'environnement utérin au moment de l'ovulation), une transmission horizontale (directe) entre individus et une transmission transplacentaire sont également possibles (en fonction de la souche virale) [8].

C. Pathogenèse

Après piqure du ruminant par le vecteur, le virus inoculé migre de la lymphe vers les ganglions lymphatiques où se produit la première réplication [61,62]. Puis le virus se dissémine vers d'autres organes, principalement la rate et les poumons, où la réplication se produit majoritairement dans les cellules endothéliales, les phagocytes mononucléaires, les lymphocytes ainsi que les cellules dendritiques [63]. Pendant la virémie, le virus est associé aux érythrocytes et aux plaquettes dans le sang et se multiplie dans les monocytes et les lymphoblastes [31]. La durée de la virémie, entre 14 et 45 jours chez les ovins et moins de 60 jours chez les bovins, est liée à la durée de vie des érythrocytes [20,31]. L'association du virus aux globules rouges pourrait favoriser son infection prolongée et sa transmission au vecteur [20].

La FCO est une maladie qui touche la majorité des ruminants domestiques et sauvages [9,64]. La période d'incubation moyenne est de 6 à 8 jours (Figure 6) [31]. Les pathologies associées à l'infection par le BTV sont bien connues chez les ovins qui développent les formes les plus sévères de la maladie, au contraire des bovins et caprins chez qui l'infection est généralement asymptomatique. Elle débute par une forte fièvre ($> 40^{\circ}\text{C}$) et par des lésions des petits vaisseaux sanguins qui sont liées aux dommages créés par le virus. Ces lésions, pour les formes aiguës, aboutissent au niveau de la face à des œdèmes, des érosions sur le mufle, des ulcères buccaux accompagnés d'hypersalivation, une conjonctivite et un larmolement. Des inflammations des bourrelets coronaires sont également observées entraînant des boiteries, de la faiblesse et de la dépression, de la nécrose musculaire et des complications d'ordre pulmonaire ou digestif [64-67]. Les ovins peuvent aussi développer une coagulopathie et des saignements excessifs [9]. Dans certains cas, des difficultés respiratoires et une cyanose au niveau de la bouche et de la langue ("*bluetongue*"), peuvent également apparaître. Dans les cas les plus graves, 10 à 12 jours après le début de la maladie, des fièvres hémorragiques, comparables à celles provoquées par le virus Ebola chez l'homme [68], sont possibles et peuvent conduire à la mort de l'animal dans 2 à 20 % des cas. Il a été suggéré qu'elles proviennent de l'augmentation de la perméabilité vasculaire causée par des médiateurs vaso-actifs et inflammatoires produits par les plaquettes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et d'autres types cellulaires [69-72]. La mortalité reste faible mais le taux de morbidité est élevé et se caractérise par un

amaigrissement rapide, une diminution de la production laitière, des infertilités transitoires et des avortements.

La cause des différences de sévérité de la maladie observées entre les bovins et les ovins n'est pas connue [61]. De plus, en fonction du pouvoir pathogène (sérotipe, souche) et de la résistance de certaines races sensibles à la maladie, l'infection entraîne une grande variabilité de l'expression de la maladie [15]. Les facteurs environnementaux comme la température peuvent également avoir un impact sur la sévérité de la maladie [64].



Figure 6 : Exemples de symptômes observés chez les ovins et les bovins lors de l'infection par le BTV.

Signes cliniques observés chez les ovins en haut (photos : C. Hamblin, *Institute for animal Health*, Pirbright, Grande-Bretagne) : **(A)** Cyanose de la langue et **(B)** Inflammation des bourrelets coronaires. Signes cliniques observés chez les bovins en bas (photos : Etienne Thiry, ULG, Belgique et Piet van Rijn, Pays-Bas) : **(C)** Ulcères du plancher de la cavité buccale et du bourrelet gingival supérieur et **(D)** Congestion du mufle et jetage mucopurulent.

D. Le virus

1. Classification

Le BTV appartient à la famille des *Reoviridae* [73] qui possède 15 genres différents incluant des pathogènes de vertébrés, d'arthropodes et de plantes. Le genre *Orbivirus* dont le BTV est l'espèce prototype, regroupe 22 espèces différentes identifiées par des tests sérologiques et par phylogénie et 13 virus non-classifiés. Il existe actuellement 27 sérotypes décrits de BTV à travers le monde qui se distinguent par la variabilité antigénique de la protéine de capsid externe VP2 [74,75].

2. Génome du BTV

Le génome viral est constitué de 10 segments d'ARN double-brin (db) linéaires. Il code sept protéines structurales et six, voire sept, protéines non structurales qui sont exprimées au cours de l'infection [76-79] (Tableau 1). Les tailles des segments vont de 822 (segment 10) à 3944 (segment 1) paires de bases (pb) [80]. Le génome total fait une taille d'environ 19 200 pb [80]. Chaque segment possède une extrémité 5' (5'-GUUAAA-3') et 3' (5'-ACUUAC-3') terminales conservées [81]. L'ensemble des extrémités 5' des ARNdb ainsi que celles de l'ensemble des transcrits viraux (ARN messenger ou ARNm) possède une coiffe méthylée [14], tandis que l'extrémité 3' n'est pas polyadénylée. La migration de l'ensemble du génome sur gel de polyacrylamide a permis de numéroté les segments du plus grand (segment 1) au plus petit (segment 10) (Figure 7C). A l'exception des segments 9 et 10, chaque segment code une seule protéine virale [82]. Le segment 9 code les protéines VP6 et NS4 [78,83] et le segment 10 code les protéines NS3, NS3A et deux nouvelles protéines décrites récemment comme étant « S10-ORF2 » et « S10-ORF2s » [79] qui, pour des simplifications de lecture, seront nommées NS5 et NS5A respectivement.

Tableau 1 : Ensemble des protéines codées par les 10 segments d'ARN double brin du BTV-8 et leurs fonctions.

Segment	Taille en paire de base	Protéines	Masse molaire (kDa)	Localisation	Fonctions ou propriétés
1	3944	VP1	150	Protéine mineure de la capsid interne (dans le core)	ARN polymérase ARN dépendante
2	2939	VP2	111	Capsid externe (<i>spike</i>)	Ligand du récepteur cellulaire, entrée du virus, hémagglutinine, antigène protecteur, spécificité de type
3	2772	VP3	103	Protéine majeure de la capsid interne (subcore)	Forme un échafaudage pour les trimères de VP7, interagit avec les complexes de transcription et l'ARN génomique
4	1981	VP4	75	Protéine mineure de la capsid interne (dans le core)	Enzyme de coiffage (guanylyltransférase), méthyltransférase, ARN 5' triphosphatase, pyrophosphatase inorganique, NTPase
5	1776	NS1	64	Protéine non structurale	Forme des tubules, lie les transcrits BTV et améliore la synthèse des protéines virales
6	1637	VP5	59	Capsid externe (globulaire)	Permet la pénétration du virus (protéine de perméabilisation membranaire), protéine fusogène, spécificité de type
7	1156	VP7	38	Protéine majeure de la capsid interne	Forme la surface du core, responsable de l'entrée du core dans les cellules d'insecte (culicoides)
8	1125	NS2	40	Protéine non structurale	Protéine phosphorylée, recrute l'ARN monocaténaire de BTV (ARNsb), forme des corps d'inclusion viraux (VIBs), site pour l'assemblage du core, fixe les ARN messagers (ARNm)
9	1049	VP6	35	Protéine mineure de la capsid interne (dans le core)	Hélicase virale, forme des hexamères en présence d'ARN du BTV, adénosine triphosphatase (ATPase)
		NS4	9,5	Protéine non structurale	Antagoniste de la réponse IFN-I et déterminant clé de la virulence
10	822	NS3	25	Protéine non structurale	Glycoprotéine, protéine membranaire, interagit avec les protéines de l'hôte (calpactine, Tsg101) et les protéines VP2 et VP5 du virus, facilite le trafic et la libération des virions, antagoniste de la réponse IFN-I
		NS3A	24	Protéine non structurale	NS3A est essentielle pour la maturation du virus dans les cellules d'insecte
		NS5	7,5	Protéine non structurale	Possède une localisation nucléolaire, pas nécessaire à la réplication du virus
		NS5A	7,5	Protéine non structurale (putative)	Possède une localisation nucléolaire, pas nécessaire à la réplication du virus

3. La particule virale

a) Structure et protéines

Des études de cristallographie et de microscopie électronique [84-86] ont permis de comprendre l'organisation de la particule virale (Figure 7B). Le BTV est un virus icosaédrique non enveloppé de 88 nm de diamètre, avec une particule virale organisée en une capsidie à double couche, externe et interne (ou core). La masse molaire de la particule virale est d'environ 120.10^6 Da [87]. La capsidie externe est composée des protéines VP2 et VP5. Le core est composé des protéines VP3 et VP7, il contient le génome viral et le complexe de transcription formé des protéines VP1, VP4 et VP6 [88]. L'association de VP3 avec le complexe de transcription (VP1, VP4 et VP6) se nomme le subcore [88] (Figure 7A).

- **Les protéines de la capsidie externe : VP2 et VP5**

Les protéines VP2 et VP5 s'assemblent pour former la couche externe de la capsidie du virus en interagissant avec les trimères de VP7. VP2, exprimée à partir du segment 2, est composée de 961 acides aminés pour un poids moléculaire de 111 kDa (kiloDalton). VP5, exprimée à partir du segment 6, est composée de 526 acides aminés pour un poids moléculaire de 59 kDa. La capsidie externe est formée de 60 trimères de VP2 [89] qui sont organisés sous forme de « triskelion » [84] et 120 trimères de VP5 [89] qui forment les motifs globulaires de la couche externe [90]. Un « triskelion » correspond à 3 molécules de VP2. Ce sont les interactions entre VP2 et VP5 qui permettent leur assemblage. VP2 est responsable de l'attachement du virus à la surface de la cellule par liaison aux glycoprotéines de surface [91] et de l'hémagglutination. La séquence de VP2 est très variable, entre 29 % et 59 % de similarité, ce qui fait de cette protéine le principal déterminant de la distinction des différents sérotypes (induction d'anticorps neutralisants). Elle est également soumise à une grande pression de sélection antigénique imposée par la réponse immunitaire humorale de l'hôte [92]. Il a été démontré que VP5 est une protéine de perméabilisation membranaire qui permet la libération des particules virales des compartiments endosomaux dans le cytoplasme [73,93].

- **Les protéines majeures de la capsid interne : VP3 et VP7**

Les protéines VP3 et VP7 s'assemblent pour former la capsid interne icosaédrique du virus, appelée le core, d'un diamètre de 75 nm. VP7, exprimée à partir du segment 7, est composée de 349 acides aminés pour un poids moléculaire de 38 kDa. VP3, exprimée à partir du segment 3, est composée de 901 acides aminés pour un poids moléculaire de 103 kDa. Le core se compose d'une couche superficielle de 260 trimères de VP7 disposés selon une symétrie icosaédrique ($T = 13$) qui est construite sur le subcore formé par auto-assemblage de 120 copies de VP3 disposées selon une symétrie icosaédrique ($T = 2$) de 12 décamères et interagit avec le complexe de transcription [94-97]. Le subcore détermine la taille globale de la capsid et dicte l'organisation des autres composants structuraux de la particule qui sont attachés ou qui interagissent avec elle, à la fois interne et externe [97]. C'est pourquoi la protéine VP3 a une séquence très conservée. Les trimères de VP7 ont pour objectif d'obstruer les pores du subcore pour maintenir les ARN simple brin (sb) viraux incorporés et les protéger de toute dégradation par les RNases. Ces pores s'ouvrent uniquement lorsque le core devient transcriptionnellement actif en présence de nucléoside triphosphate (rNTP) [86,96].

- **Les protéines mineures de la capsid interne : VP1, VP4 et VP6**

Le core renferme le génome viral ainsi que les protéines VP1, VP4 et VP6 formant le complexe de transcription [89]. Ces protéines interviennent dans la transcription et la réplication de l'ARN viral. Afin d'être associées au core, les protéines VP1, VP4 et VP6 forment un complexe avec les décamères de VP3.

- **La protéine VP6**

La protéine VP6, exprimée à partir du segment 9, est composée de 329 acides aminés pour un poids moléculaire de 36 kDa. VP6 est une hélicase à ARN présente en 60 exemplaires par particule virale qui possède toutes les caractéristiques fonctionnelles et structurales d'autres hélicases virales et cellulaires (tel que l'hydrolyse de l'ATP et des sites de liaison aux acides

nucléiques) [89]. Elle catalyse le déroulement des ARNdb, possède des sites de liaison à l'ARN et à l'ATP et présente une fonction ATPase dépendante de l'ARN [98]. Il a été démontré que VP6 est capable de se lier à l'ARNsb et l'ARNdb synthétisé après la transcription [99,100].

➤ La protéine VP1

La protéine VP1, exprimée à partir du segment 1, est composée de 1302 acides aminés pour un poids moléculaire de 150 kDa. VP1 est une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) présente en 12 exemplaires par particule virale [73,101-104]. Des expériences *in vitro* ont montré que VP1 peut synthétiser les dix ARNdb simultanément à partir des matrices ARNsb en absence de toute autre protéine virale [101,105]. De plus, la présence de dinucléotides (GpG), amorçant l'activité de la polymérase, et d'une structure en coiffe à l'extrémité 5' de la matrice des ARNsb permet d'augmenter l'activité catalytique de VP1 et ainsi d'augmenter l'efficacité de la réplication [105]. VP1 possède également une activité transcriptionnelle au sein du core [106,107] où elle permet de transcrire plusieurs copies des 10 segments d'ARNdb qui rejoindront le cytoplasme où ils seront traduits.

➤ La protéine VP4

La protéine VP4, exprimée à partir du segment 4, est composée de 644 acides aminés pour un poids moléculaire de 76 kDa. VP4 est une méthyltransférase présente en 24 exemplaires par particule virale qui permet le coiffage des transcrits au sein du core. VP4 possède des activités de méthyltransférase, de guanylyltransférase et d'ARN triphosphatase en l'absence de toute autre protéine virale [14,108,109]. Pour les transcrits de BTV, l'ajout d'une méthylation sur le premier nucléotide de la coiffe par l'ARN nucléoside-2'-O-méthyltransférase est nécessaire pour former une structure coiffe qui permet d'améliorer l'efficacité de la traduction des ARNm [92]. VP4 favorise également l'activité de transcription en retirant le pyrophosphate inorganique qui bloque la polymérase [108].

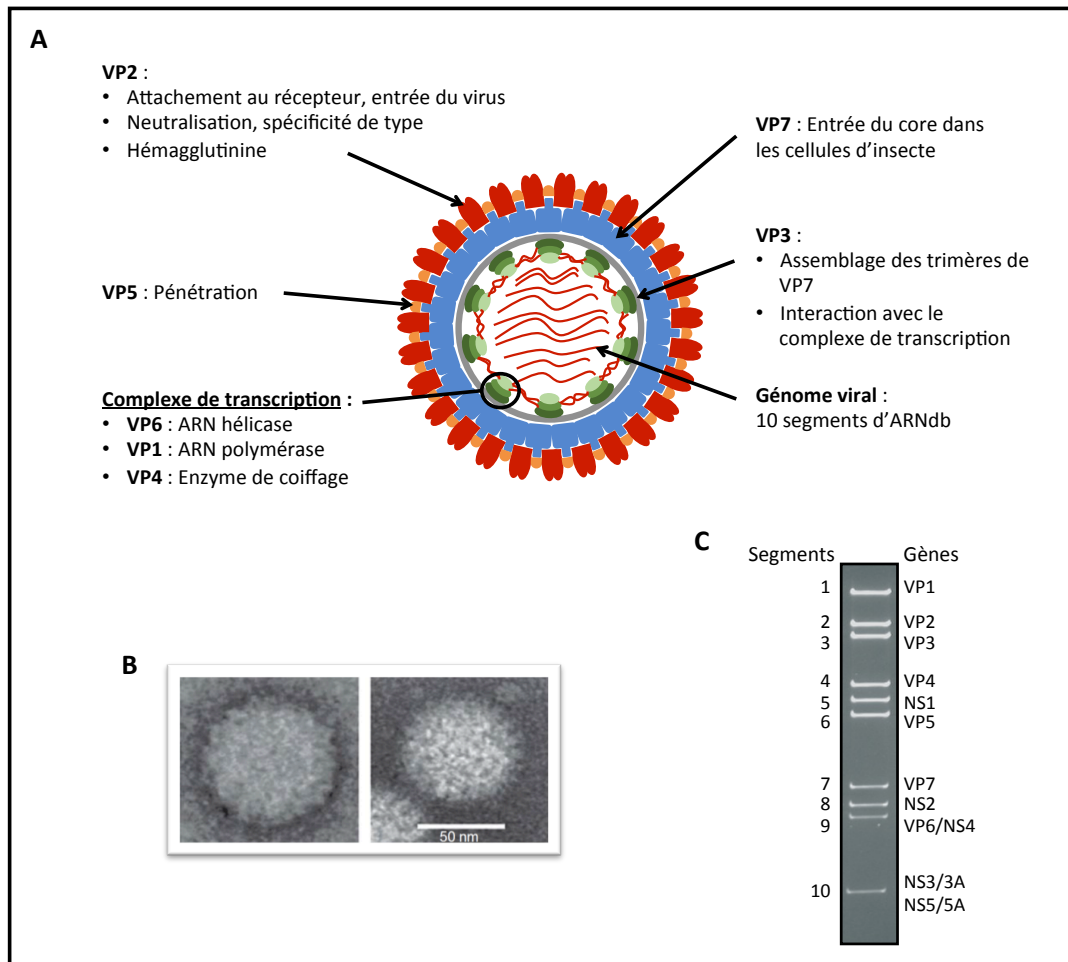


Figure 7 : Organisation et fonctions des protéines structurales et du génome du BTV.

(A) Les protéines VP2 et VP5 forment la capside externe, les protéines VP3 et VP7 forment la capside interne, ou core, qui renferme le génome viral et le complexe de transcription formé des protéines VP1, VP4 et VP6. **(B)** Microscopie électronique de la particule (gauche) et du core (droite) du BTV. Les photos sont extraites de Mertens, P.P.C. & al, *Virology*, 1987 [110]. **(C)** Profil de migration du génome du BTV obtenu par migration sur gel de polyacrylamide.

b) Les protéines non structurales

Le virus possède six voire sept protéines non-structurales exprimées au cours de l'infection : NS1, NS2, NS3, NS3A, NS4, NS5 et possiblement NS5A. Les caractéristiques ainsi que les fonctions de NS3 seront détaillées dans la partie I.F (page 54) de ce manuscrit.

- **La protéine NS1**

La protéine NS1, exprimée à partir du segment 5, est composée de 552 acides aminés pour un poids moléculaire de 64 kDa. Elle est exprimée dans le cytoplasme des cellules infectées à des stades très précoces du cycle viral [111]. Elle intervient dans la réplication comme régulateur positif de l'expression des gènes viraux en favorisant la traduction des transcrits de BTV [112]. Cette fonction s'exercerait par la liaison spécifique de NS1 à l'extrémité 3' conservée (5'-ACUUAC-3') des ARNm viraux [112]. Elle est donc capable de discriminer les ARNm cellulaires possédant une extrémité 3' polyadénylée des ARNm viraux possédant l'extrémité 3' conservée. De plus, en se polymérisant, NS1 forme des structures tubulaires dans le cytoplasme des cellules infectées en absence de toute autre protéine virale (Figure 8) [113-115]. La fonction de ces structures n'est pas encore déterminée, cependant il a été supposé que la formation de ces tubules permettrait de contrôler le niveau de NS1 soluble [92] et de conférer à NS1 un rôle dans la cytopathogénicité du virus [116]. L'utilisation de la microscopie électronique a permis de démontrer, que dans certaines conditions, il peut y avoir une association entre les structures tubulaires formées par NS1 et les corps d'inclusions viraux (VIBs) formés par NS2 [113]. Cette association pourrait être à l'origine du transport des virus matures des VIBs au cytosquelette des cellules infectées [113].

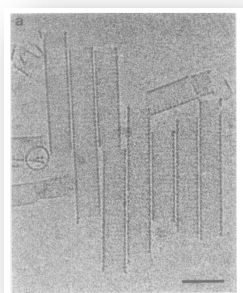


Figure 8 : Image des tubules de NS1 par cryoélectromicroscopie.

On peut observer que les tubules de NS1 sont parallèles (barre d'échelle = 100 nm). Extrait de Hewat, E. & al, *journal of structural biology*, 1992 [115].

- **La protéine NS2**

La protéine NS2, exprimée à partir du segment 8, est composée de 354 acides aminés pour un poids moléculaire de 41 kDa. Après NS1, c'est la seconde protéine virale la plus abondante dans les cellules infectées [117]. NS2 est le constituant majeur des VIBs ou viroplasmes qui possèdent une localisation périnucléaire (Figure 9) et qui sont considérés

comme le site d'assemblage des cores viraux [118-121]. Ils contiennent les protéines de core ainsi que l'ARN viral [117,118,122]. Il a été démontré que NS2 est suffisante à elle seule pour produire les VIBs qui sont morphologiquement similaires à ceux produits lors de l'infection [117,121]. NS2 possède un site de liaison à l'ARN qui lie spécifiquement les ARNsb et une activité NTPase [117,123]. La liaison de NS2 aux ARNsb est nécessaire afin que ceux-ci soient empaquetés de manière optimale dans le core. Grâce à son activité phosphohydrolase, NS2 sélectionne et condense les segments d'ARNsb lors de l'encapsidation du génome [123]. De plus, NS2 semblerait être la seule protéine virale à être phosphorylée pendant l'infection [117,122]. Celle-ci se phosphoryle par l'intermédiaire de la protéine caséine kinase 2 (CK2) sur les deux résidus sérine (S) en positions 249 et 259 [122]. La phosphorylation de NS2 est nécessaire au contrôle et à la formation des VIBs pour fournir la matrice pour l'assemblage viral [14,122].

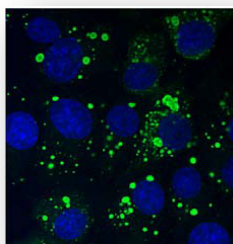


Figure 9 : Immunofluorescence permettant de visualiser les corps d'inclusion viraux (VIBs) formés par NS2.

Les VIBs (en vert), qui possèdent une localisation périnucléaire, sont visualisés suite à l'infection de cellules BSR avec le BTV-10 (24 heures post-infection) et immunomarkés avec un anticorps anti-NS2. Extrait de Kar, AK. & al, *BMC Molecular Biology*, 2007 [121].

- **La protéine NS4**

En 2011, une nouvelle protéine non structurale de BTV a été découverte : la protéine NS4 [78,83,124]. Elle est composée de 77 acides aminés pour un poids moléculaire de 9,5 kDa. NS4 est codée à partir d'un second cadre de lecture (+ 1) porté par le segment 9 qui code par ailleurs pour la protéine VP6. En fonction du cycle viral et/ou des conditions expérimentales, NS4 présente une distribution subcellulaire variable. Majoritairement cytoplasmique dans les étapes précoces de l'infection, elle serait localisée préférentiellement au sein des nucléoles 24 h post-infection (p.i.) grâce à un motif d'adressage nucléolaire présent à son extrémité N-terminale (N-ter) [78,83]. De plus, il a été montré que la présence de NS4 confère un avantage pour la réplication du virus dans des cellules prétraitées aux interférons de type I (IFN-I) suggérant ainsi que NS4 est un antagoniste de la réponse IFN-I et un déterminant clé de la virulence du BTV [83,125]. De façon remarquable, la protéine NS4

semble bloquer d'autres promoteurs que ceux liés à la réponse IFN-I, suggérant ainsi un blocage de la transcription de façon globale dans les cellules [125]. Dans le cytoplasme, NS4 est décrite pour s'associer aux gouttelettes lipidiques [78] qui sont des organelles interagissant avec différents compartiments cellulaires. Une observation similaire a été faite pour le Rotavirus où les protéines VP2, VP6 et NSP5 s'associent également aux gouttelettes lipidiques, par l'intermédiaire des viroplasmes, afin de former des corps d'inclusions viraux fonctionnels indispensables à la production de virions matures [126]. Ces résultats décrits chez le Rotavirus laissent supposer que ces gouttelettes lipidiques pourraient avoir un rôle tout aussi important au cours de la réplication du BTV.

- **La protéine NS5**

La protéine non-structurale NS5 a été découverte en 2015 par l'équipe de Dr. Massimo Palmarini à la suite d'études *in silico* [79]. Le nom attribué à cette protéine depuis sa découverte est « S10-ORF2 » car elle est exprimée à partir du segment 10 par l'intermédiaire d'un décalage du cadre de lecture (+ 1) par rapport à celui permettant l'expression de NS3/NS3A. Cependant, comme aucun anticorps spécifique de cette protéine n'a permis pour le moment de valider sa présence au cours du cycle viral, elle n'a pas pu être décrite comme étant la protéine NS5 de BTV. De plus, cette protéine pourrait être synthétisée sous deux isoformes « S10-ORF2 » et « S10-ORF2s » qui seront nommés par la suite NS5 et NS5A respectivement. NS5 fait 59 acides aminés pour un poids moléculaire de 7,5 kDa. NS5A est une forme plus courte de NS5, à laquelle il manque 9 acides aminés en N-ter [79]. Il a été démontré que NS5 n'est pas nécessaire à la réplication du BTV car des mutants de délétion de la protéine se répliquent aussi bien que le BTV WT (*Wild Type* ou sauvage) [79]. De plus, des études de localisation ont permis de révéler que NS5 se localise dans le nucléole des cellules transfectées, comme NS4 [83], par l'intermédiaire d'un signal de localisation nucléolaire (NoLs) [79]. Le fait que NS5 possède la même localisation subcellulaire que NS4 suggère que les deux protéines pourraient avoir une fonction semblable et/ou synergique.

4. Cycle de réplication

Le cycle de réplication du BTV dans les cellules de mammifère et dans les cellules d'insecte n'est pas le même.

Dans les cellules de mammifère, 8 à 10 heures (h) p.i., le virus est détecté dans le surnageant de cellules Vero montrant ainsi que le cycle de réplication des orbivirus est très rapide [127]. L'attachement du virus à la surface de la cellule s'effectue par l'intermédiaire de la protéine VP2 qui se lierait à des glycoprotéines présentes à la surface cellulaire (Figure 10) [20,91]. Cependant, le récepteur du BTV reste encore à identifier mais il pourrait faire intervenir une sialoglycoprotéine membranaire seule ou en association avec un corécepteur [128]. Cette première interaction déclenche l'internalisation du virus qui s'effectue par une endocytose clathrine-dépendante [128,129]. L'acidification de l'endosome entraîne un changement de conformation des protéines de la couche externe qui dissocie VP2 de la capsid et induit la fusion de VP5 avec la membrane endosomale. 1 h après internalisation du virus dans la cellule hôte, les protéines de la capsid externe sont hydrolysées permettant l'activation de la transcriptase virale [130] et ainsi la libération du core transcriptionnellement actif dans le cytoplasme [131,132].

Ainsi activé, le core réalise une transcription précoce à partir des brins d'ARN génomique bicaténaires à l'aide de l'activité enzymatique ARN polymérase ARN dépendante portée par VP1. VP1 transcrit alors plusieurs copies des 10 segments d'ARNdb en ARNsb positif [101] en association avec l'activité hélicase de VP6. Les ARNm sont ensuite coiffés et méthylés par l'activité guanylyltransférase et méthyltransférase de VP4 [108,109,133]. Ils sont alors libérés du core dans le cytoplasme de la cellule hôte par des pores situés au sommet des 5 axes de symétrie de la capsid icosaédrique où ils seront traduits.

Dans le cytoplasme, les ARNm viraux servent également de matrice à la synthèse des ARN négatifs afin de générer les ARNdb génomiques [82,106,107]. Cette synthèse se produit simultanément à la morphogénèse des particules provirales. Ces étapes ont lieu dans les VIBs présents dans le cytoplasme de la cellule infectée formés par NS2 [118,121,122]. NS2 se fixe sur les ARNsb et intervient dans leurs répliquions, impliquant VP1, afin de former les ARNdb au sein des cores néo-formés [121]. De plus, NS2 pourrait également intervenir dans

l'incorporation d'une seule copie de chaque segment d'ARN et contrôler le niveau de VIBs afin de fournir la matrice pour l'assemblage viral [14,134,135].

L'assemblage du core s'effectue autour des ARNs complexes à NS2 et associés à VP1 et VP4 qui permettent de recruter VP6 et d'interagir avec les décamères de VP3 [90,136-138]. Cette interaction permet de former le subcore par auto-assemblage des protéines VP3 autour de ce complexe. La protéine VP7 n'ayant pas la capacité de s'auto-assembler, elle se dispose sur le subcore pour stabiliser le core [90]. Après cet assemblage, le core est libéré des VIBs afin d'être revêtu de la capside externe (VP2 + VP5) pour former des virions matures. Les trimères de VP2 interagissent avec les trimères de VP7 et les trimères de VP5 comblent les trous formés par les triskélions de VP2. VP5 fait peu d'interactions avec VP7 lui permettant ainsi de changer de conformation pour le processus d'entrée et de perméabilisation de la membrane endosomale [132]. Du fait de son interaction avec VP2 [139] et VP5 [140], il se pourrait que NS3 maintienne les deux protéines de la capside externe en position pour l'assemblage final des particules matures [140].

Après assemblage et formation des particules matures, l'interaction de NS3 avec VP2 et la calpactine favorise le trafic des virions et leur ciblage à la membrane plasmique [139,141]. De plus, l'association des structures tubulaires formées par NS1 et des VIBs pourrait favoriser le transport des virus matures vers le cytosquelette des cellules infectées [113].

La libération du virus implique la protéine NS3. Dans des temps précoces, NS3 favoriserait la libération des particules virales par bourgeonnement alors que dans des temps plus tardifs, lorsque NS3 est fortement exprimée, la lyse de la cellule infectée serait à l'origine de la libération des particules virales [142].

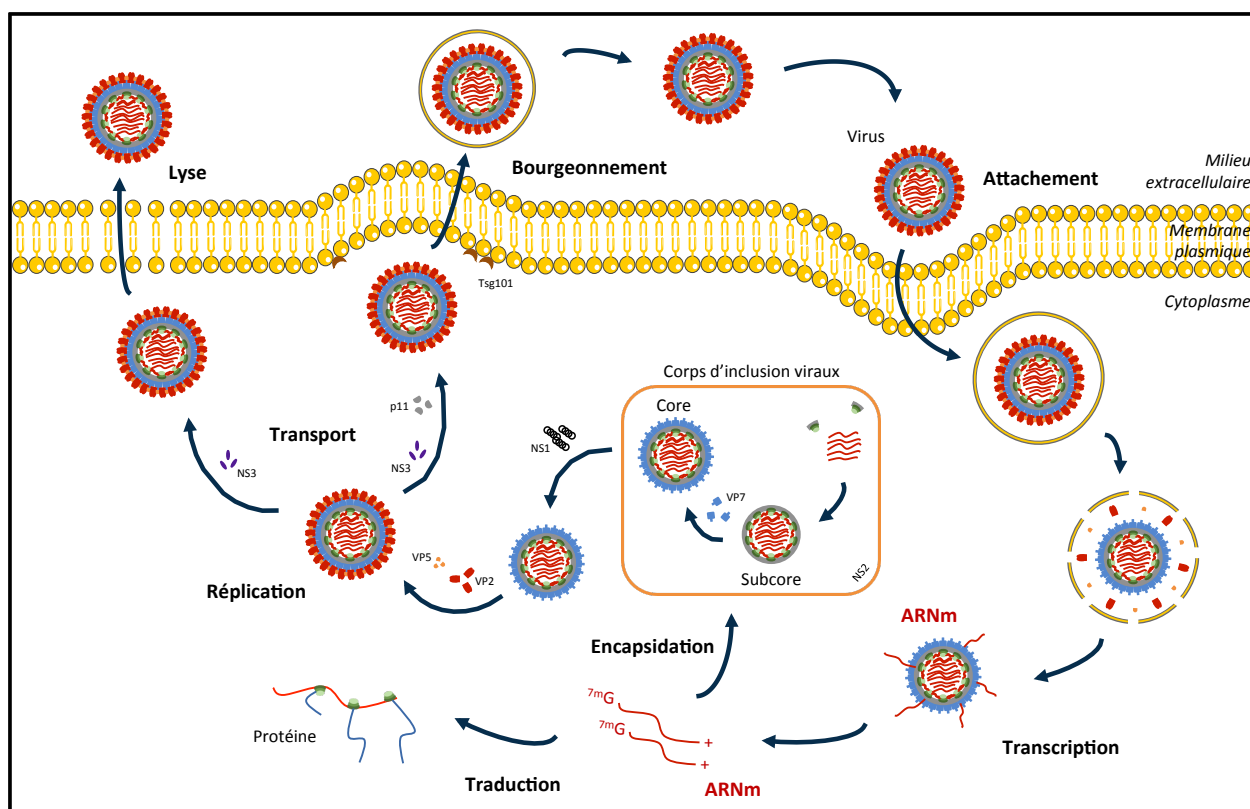


Figure 10 : Cycle de réplication du BTV.

Dans les cellules d'insecte, le cycle de réplication du BTV est bien moins connu. L'attachement du virus à la surface de la cellule s'effectue par l'intermédiaire de la protéine VP7 qui se lie aux glycosaminoglycanes et à d'autres récepteurs cellulaires pour faciliter l'entrée du virus [53,96,143,144]. Dans les cellules d'insecte, les particules subvirales et les cores sont 100 à 500 fois plus infectieux que dans les cellules de mammifère [53] produisant, dans ce type cellulaire, une infection persistante [145]. Les mécanismes employés par le core pour se déplacer dans les cellules d'insecte restent inconnus. Après assemblage et formation des particules matures, la libération du virus se produit exclusivement par bourgeonnement, NS3/NS3A jouant un rôle prépondérant dans ce mécanisme [146].

Étant donné le peu de connaissance sur le génome du culicoïde, une alternative possible à l'étude des mécanismes de réplication du BTV chez l'insecte peut être la drosophile (*Drosophila melanogaster*) dont le génome a été séquencé avec succès. En effet, il a été démontré que le BTV se réplique parfaitement *in vivo* chez *Drosophila melanogaster* [145].

E. Réponse immune et vaccins

1. Réponse immunitaire innée contre le BTV

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense suite à l'intrusion d'un agent pathogène dans l'organisme. Elle se caractérise de façon prédominante pour les virus, par la production d'IFN-I essentiellement α/β et de cytokines pro-inflammatoires, lesquels participent largement à la mise en place de la réponse adaptative humorale et cellulaire.

a) La voie des interférons de type I (IFN-I)

Après l'entrée d'un virus dans l'organisme, la réponse immunitaire innée se met en place suite à la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques aux pathogènes : les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Il en existe quatre principaux ciblant les virus : les ARNdb, les ARNsb, l'ADN CpG non méthylés et les glycoprotéines d'enveloppe. Ces PAMPs sont reconnus par des récepteurs spécialisés, les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) qui permettent de distinguer les molécules du soi et du non-soi et de promouvoir une réponse antimicrobienne contre de multiples pathogènes. Il existe deux familles de PRRs bien connues : les TLRs (*Toll-Like Receptor*) et les RLRs (*RIG-I Like Receptor*). Les TLRs sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique ou associés aux membranes endosomales. Ils reconnaissent les ARNsb, les ADNsb et les protéines virales. Les RLRs (RIG-I pour *Retinoic acid-Inductible Gene 1*, MDA5 pour *Melanoma Differentiation-Associated protein 5* et LGP2 pour *Laboratory of Genetics and Physiology 2*) sont activés par la présence d'ARN viraux cytoplasmiques. Après activation par leurs ligands respectifs, ces senseurs recrutent différentes protéines adaptatrices qui interagissent à leur tour avec des kinases qui sont responsables de l'activation des facteurs de transcription IRF-3/7 (*Interferon Regulatory Factor*) et NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) qui sont impliqués dans l'expression des gènes codant les IFN-I. L'IFN-I produit est sécrété dans le milieu extracellulaire où il se fixe sur son récepteur IFNAR (*IFN-Alpha Receptor*) composé de deux sous-unités (IFNAR1 et IFNAR2). IFNAR1 est associé à la tyrosine kinase 2 (TYK2) et IFNAR2 est associé à JAK1 (*Janus tyrosine Kinase 1*) et STAT2 (*Signal Transducer and Activator of Transcription protein 2*). L'interaction de l'IFN-I avec une des sous unités du récepteur IFNAR conduit au recrutement de la

seconde sous-unité. Cette liaison déclenche l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT (*Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) en induisant dans un premier temps la phosphorylation des kinases TYK2 et JAK1 et dans un second temps la phosphorylation de STAT2 et STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription protein 1*). Le dimère STAT1/STAT2 activé est dissocié d'IFNAR2 et s'associe dans le cytoplasme à IRF9 pour former le facteur de transcription ISGF3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*). Ce complexe migre dans le noyau où il se lie au promoteur ISRE (*IFN-Stimulated Response Elements*) pour activer l'expression de gènes appelés ISGs (*Interferon-Stimulated Genes*) dont les produits sont impliqués dans la réponse antivirale.

b) Activation de la voie IFN-I dans le contexte BTV

Depuis les années 1970, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le BTV (différents sérotypes et souches) est un fort inducteur de la réponse IFN-I et ce, chez différentes espèces modèles (ovine, bovine, souris, humaine) [147-151]. Cependant, les mécanismes impliqués dans ce phénomène sont restés longtemps inconnus. Dans des cellules infectées par le BTV, l'utilisation d'ARN interférants (siARNs) inhibant l'expression de multiples composants essentiels de la voie IFN, a permis à Émilie Chauveau (une étudiante en thèse encadrée par le Dr. Damien Vitour) de montrer le rôle des ARN hélicases RIG-I et MDA5 dans la production d'IFN- β et la réponse antivirale (Figure 11) [150].

Comme le BTV cible les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) et plasmacytoïdes (pDCs) dans les phases précoces de l'infection, la production d'IFN- α/β a également été étudiée dans ces deux types cellulaires suite à l'infection par le BTV. Des forts niveaux d'IFN- α/β ont été observés dans les pDCs, et non dans les cDCs, après exposition au BTV même en absence de toute réplication virale [152]. L'utilisation de différents inhibiteurs a ensuite permis de révéler le rôle clé des protéines MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), PKR (*Protein Kinase RNA-activated*) et SAPK/JNK (*Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun NH2-terminal Kinase*) dans la production d'IFN- α/β , indépendamment des TLR7/8 [152,153].

c) Le BTV évolue pour échapper à la réponse innée

- **Blocage de la synthèse d'IFN-I**

Lors de recherches visant à étudier l'impact du BTV sur la voie IFN-I, une étude a démontré que la protéine NS3 possède la capacité de bloquer cette voie de signalisation [154]. Les mécanismes moléculaires responsables de ce phénomène seront décrits en détail dans la partie I.F.2 (page 56) de ce manuscrit de thèse. Comme mentionné précédemment, en plus de NS3, la protéine NS4 est également décrite pour bloquer la voie IFN-I (cf. partie D.3.b) page 44) [125].

- **Blocage de la réponse d'IFN-I**

Une étude a démontré que le BTV a également la capacité de bloquer la voie de signalisation JAK/STAT en bloquant la phosphorylation de STAT1 et en régulant négativement l'expression des kinases JAK1 et TYK2 (Figure 11) [155]. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de ce phénomène restent encore inconnus.

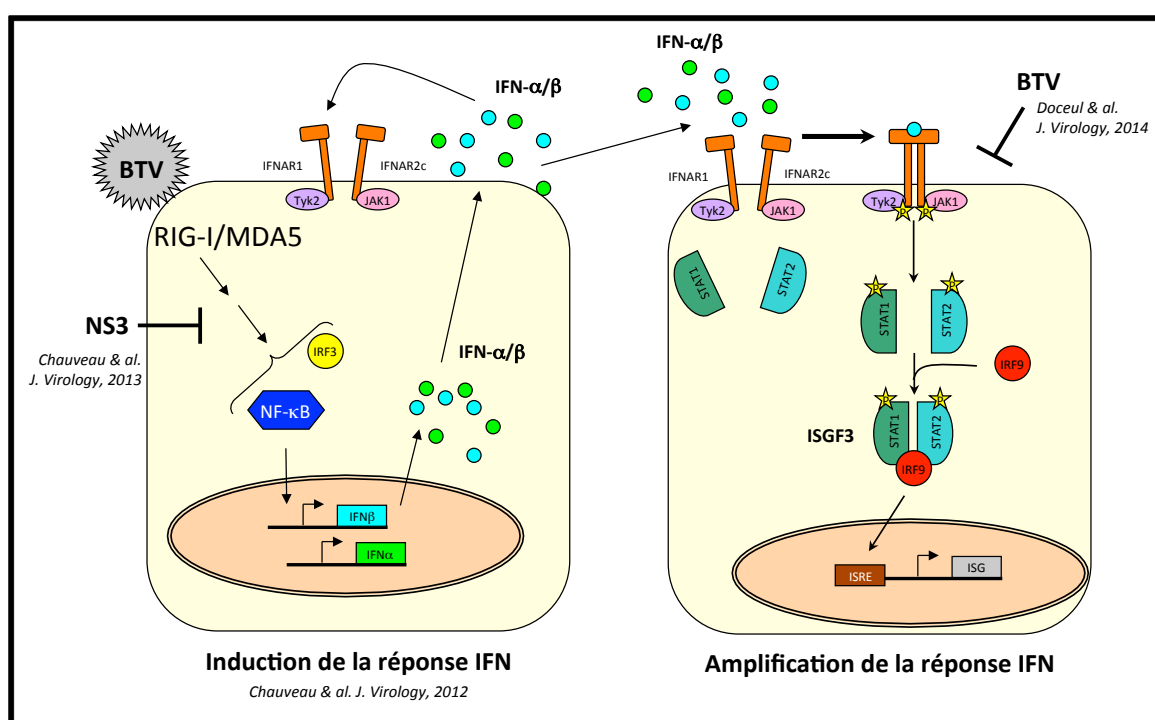


Figure 11 : Impact du BTV et de sa protéine NS3 sur la voie des interférons de type I (IFN-I).

La protéine NS3 bloque l'induction de la synthèse d'IFN-α/β en bloquant la cascade de signalisation en aval de RIG-I et MDA5 et en amont ou au niveau des IRF3 kinases. Le BTV a également la capacité de bloquer la voie de signalisation JAK/STAT en bloquant la phosphorylation de STAT1.

2. Réponse immunitaire humorale

Lors d'une infection par le BTV, des anticorps neutralisants dirigés contre les protéines de la capside externe, VP2 et VP5, sont produits [156,157]. Comme VP2 détermine le sérotype, la production d'anticorps contre cette protéine prévient d'une réinfection par le même sérotype [158-161], et plus rarement une protection partielle contre d'autres sérotypes [162,163]. Au sein de VP2, deux domaines hydrophiles (acides aminés 199 à 213 et acides aminés 321 à 346) contiennent de multiples épitopes de neutralisation [164]. Des mutations dans ces domaines génèrent des souches de BTV qui présentent des caractéristiques de neutralisation distinctes [165].

Expérimentalement, il a été démontré qu'une co-expression de VP2 avec VP5 améliore la réponse aux anticorps neutralisants par l'ovin et donc augmente la réponse immunitaire [156,157,166,167]. Ceci pourrait venir du fait que VP5 stabilise la conformation de VP2 [161,168].

3. Réponse immunitaire cellulaire

Chez le mouton, l'infection par le BTV conduit à une forte augmentation de la production de lymphocyte T CD8+ [169,170]. La production de ces cellules par l'organisme permet d'éliminer toutes cellules cibles infectées par lyse afin de limiter la diffusion du virus et donc la production virale. La réponse immunitaire liée aux lymphocytes T cytotoxiques (LTC) est fortement activée en réponse à la reconnaissance des protéines NS1 et VP2 [171]. Les LTC reconnaissent également les protéines VP3, VP5 et VP7 mais dans une moindre mesure [171].

En parallèle, les protéines virales VP2 et VP7 induisent la synthèse de lymphocytes T auxiliaires (T CD4+) produisant des cytokines afin d'activer les LTC et les macrophages.

4. Vaccinologie

A l'heure actuelle, la vaccination des ruminants est l'une des méthodes permettant d'empêcher efficacement la propagation de la maladie. Du fait de la multiplicité des

sérotypes, autant de souches vaccinales doivent exister et ce en raison du rôle clé de la protéine VP2 dans l'immunité protectrice [73].

Le premier vaccin contre le BTV provient d'un virus vivant atténué produit en Afrique du Sud par Sir Arnold Theiler en 1906 [9]. Ce type de vaccin a longtemps été utilisé pour lutter contre le BTV en Afrique australe mais également en Corse, aux Baléares et en Italie. Il est obtenu par des passages successifs de souche virulente sur des œufs embryonnés et/ou sur culture cellulaire (BHK-21 ou Vero) [8]. Même si les vaccins atténués offrent une protection solide en une seule injection et qu'ils sont peu coûteux à produire, ces vaccins ne sont pas toujours sûrs car leur atténuation peut être difficile à contrôler et peuvent parfois subir une réversion vers la virulence induisant une virémie et des légers signes cliniques après injection chez des espèces sensibles [73,172,173]. Ils peuvent alors être disséminés dans l'environnement par les vecteurs et subir des réassortiments avec des virus sauvages [172]. De ce fait, ces vaccins ne sont plus commercialisés en Europe depuis 2006.

En Europe, seuls les vaccins inactivés contre le BTV sont autorisés. Même si ces vaccins génèrent une immunité efficace et protectrice, celle-ci reste de plus courte durée par rapport aux vaccins vivants atténués [172]. Les particules virales sont inactivées par exposition à un agent physique (UVs, chaleur, irradiation gamma) ou chimique (formol, bêta-propiolactone, éthylène-imine binaire) puis les particules sont purifiées [8]. Deux injections du vaccin sont nécessaires pour induire une immunité protectrice à long terme [172]. Malgré leur coût de production et leur mise en œuvre contraignante, leur utilisation est favorisée du fait de leur efficacité, de leur sûreté et de leur stabilité [73]. Depuis 2005, tous les pays européens utilisent ce type de vaccins commercialisés pour les sérotypes 1 et 8 [8,172]. A l'heure actuelle, aucun vaccin inactivé ne permet toutefois de différencier un animal vacciné d'un animal infecté (non DIVA = *Differentiation between Infected and Vaccinated Animals*) [73].

Malgré l'efficacité des vaccins inactivés, d'autres approches vaccinales sont en cours de développement pour respecter au mieux les trois critères requis pour élaborer un vaccin idéal contre la FCO : **1)** tenir compte de la multiplicité des sérotypes, **2)** tenir compte de la sécurité du vaccin et **3)** respecter la propriété DIVA pour permettre de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés pour faciliter les échanges [73].

Des vaccins obtenus par génération de pseudo-particules virales (VLP pour *Virus-Like Particles*) par auto-assemblage des protéines structurales (VP2, VP5, VP3, VP7) recombinantes et synthétisées par un système baculovirus dans des cellules d'insectes, ont été produits [166]. En plus d'être naturellement inoffensives et de ne nécessiter aucun processus d'inactivation car elles ne contiennent aucune structure infectieuse, les VLP peuvent servir de vaccins multivalents car les VP2 provenant de plusieurs souches de BTV peuvent y être intégrées [167]. Elles se sont révélées immunogènes, efficaces, réduisant la virémie et évitant tout signe clinique [174,175].

Une autre alternative possible est représentée par les vecteurs recombinants exprimant les protéines immunogènes du BTV. Ils possèdent de nombreux avantages : ils sont peu coûteux, sûrs, offrent une immunité à long terme en une seule injection, permettent de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés (DIVA) et sont flexibles pour inclure différents sérotypes [73].

Depuis la mise en place de la génétique inverse, des stratégies vaccinales ont été élaborées visant à introduire des mutations ciblées dans le virus entraînant son atténuation. L'une de ces stratégies est les vaccins DISC (*Disabled Infectious Single Cycle*) qui sont basés sur la production de particules virales non répliquatives délétées d'un ou plusieurs gènes essentiels à la réplication [176]. Ces vaccins combinent plusieurs avantages : ils induisent une forte protection par l'intermédiaire de la production d'anticorps neutralisants, ne se répliquent pas et protègent contre les signes cliniques.

Récemment des vaccins DISA (*Disabled Infectious Single Animal*) ont été élaborés reposant sur l'absence d'expression des protéines NS3/NS3A [177]. Contrairement à l'approche DISC, ces vaccins permettent de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés (DIVA). Bien qu'ils se répliquent chez le mouton, ils ne provoquent aucun signe clinique ni virémie. Ils possèdent une sécurité accrue et sont protecteurs. Ces vaccins sont applicables à plusieurs sérotypes par échange du segment 2 (VP2).

F. La protéine non structurale NS3

La protéine NS3 est une protéine multifonctionnelle produite en moins grande quantité dans les cellules infectées que les protéines NS1 et NS2. Après formation des virions matures, NS3

possède un rôle primordial dans le transport et la libération des particules dans le milieu extracellulaire. Il a été démontré qu'afin d'établir une infection, elle possède un rôle essentiel dans le blocage de la réponse IFN-I.

1. Caractéristiques générales et localisations

La protéine non structurale codée par le segment 10 est synthétisée sous deux isoformes lors de l'infection : NS3 qui fait 229 acides aminés pour un poids moléculaire de 25 kDa et NS3A qui fait 216 acides aminés pour un poids moléculaire de 24 kDa. NS3A est une forme plus courte de NS3, à laquelle il manque 13 acides aminés à son extrémité N-ter [178,179]. Ce second isoforme résulte de l'initiation de la traduction via un second codon d'initiation présent sur le segment 10 en position 40-42. NS3 et NS3A sont synthétisées en plus grande quantité dans les cellules d'insecte que dans les cellules de mammifère [180,181]. Elles sont les seules protéines membranaires codées par le génome du BTV et se localisent à la membrane plasmique, au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi [141,142,182]. Comme le montre la Figure 12, la protéine NS3 est composée de deux domaines transmembranaires séparés par un domaine extracellulaire et encadrés par un long domaine N-ter et un court domaine carboxy-terminal (C-ter) cytoplasmique [181,183]. NS3 est une glycoprotéine possédant deux sites de glycosylation prédits au niveau des acides aminés 63 et 150 de la protéine [141,183]. Cependant, seule la glycosylation en position 150 a été validée expérimentalement [183].

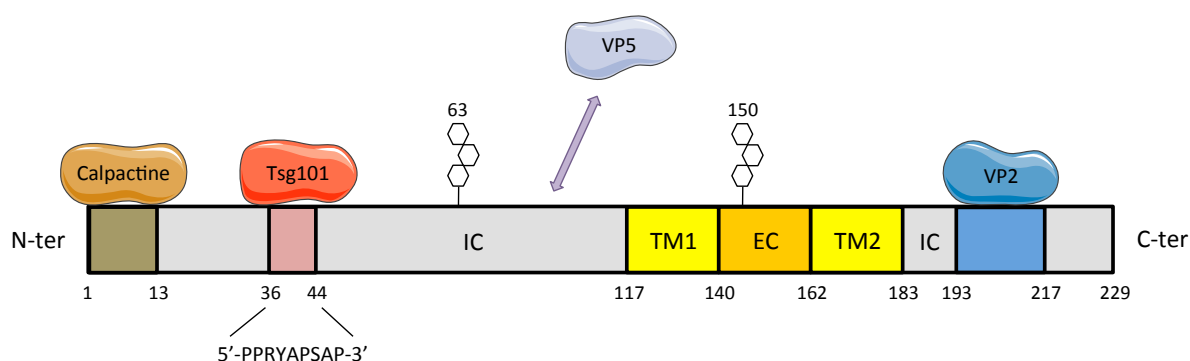


Figure 12 : Représentation schématique de la protéine NS3 et ses interactions avec la calpactine, Tsg101, VP2 et VP5.

La protéine NS3 possède deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2, jaune), un domaine extracellulaire (EC, orange) et deux domaines cytoplasmiques (IC, gris). NS3 possède des interfaces de liaison à la calpactine (brun), à Tsg101 (rouge) et VP2 (bleu). Aucune interface de liaison n'a pour le moment été mise en évidence pour l'interaction NS3-VP5. NS3 possède également deux sites de glycosylation prédits en position 63 et 150.

Il a été démontré que le BTV est capable de se répliquer efficacement en l'absence de toute expression de ces deux protéines montrant que celles-ci ne sont pas nécessaires pour la réplication du virus [184]. En outre, seule NS3 est essentielle pour la propagation du BTV dans des cellules de mammifère alors que dans les cellules d'insecte les protéines NS3 et NS3A semblent nécessaires à la libération du virus [184].

2. Fonctions associées à la protéine NS3

a) NS3 est impliquée dans le transport et la libération des particules virales

Initialement décrite pour participer à la libération des particules virales par lyse cellulaire [182], la protéine NS3 semble également être impliquée dans un mécanisme de sortie par bourgeonnement [139-141,185]. Ci-dessous vont être expliqués plus en détail les mécanismes utilisés par NS3 pour permettre la libération des nouvelles particules virales (Figure 14).

- **Libération par lyse cellulaire**

Des études ont montré que NS3 est une protéine dite toxique lorsqu'elle est exprimée seule dans des cellules de mammifère ou d'insecte [178,186]. Suite à cette observation, il a été démontré que NS3, par l'intermédiaire de son association à de nombreuses membranes cellulaires, possède une fonction de viroporine qui lui permet de faciliter la sortie du virus en induisant une perméabilisation de la membrane plasmique entraînant ainsi la lyse des cellules infectées [182]. Des mutants de NS3 ont permis de révéler que c'est le domaine transmembranaire 1 (TM1) de NS3 qui est impliqué dans cette activité et que l'activité viroporine est en corrélation avec la perte de localisation du mutant à l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique [182]. En effet, des mutations en position 131-133 d'une alanine (A) et de deux leucines (L) en trois acides glutamiques (E), mutation nommée ALL131-133EEE (Figure 13), génère un mutant imperméable à l'hygromycine B (qui pénètre dans les cellules dont la membrane plasmique a été perméabilisée) révélant ainsi que les acides aminés 131-133 sont cruciaux pour l'activité viroporine de NS3 [182].



Figure 13 : Mutation ALL131-133EEE dans le domaine transmembranaire1 (TM1) de NS3.

Le mutant ALL131-133EEE possède des mutations en position 131-133 du domaine TM1 de NS3 remplaçant une alanine (A) et deux leucines (L) en trois acides glutamiques (E). Extrait de Han, Z. & Harty, R.N., *The journal of biological chemistry*, 2004 [182].

- **Libération par bourgeonnement cellulaire**

Afin de permettre le transport et la libération des particules matures par bourgeonnement, NS3 possède des sites de liaisons aux protéines de la capsid externe (VP2 et VP5), à la calpactine (résidu 1 à 13) et à Tsg101 (résidu 36 à 44 via le motif 5'-PPRYAPSAP-3') qui est un composant du complexe protéine ESCRT-I.

- **Interaction de NS3 avec les protéines de la capsid externe**

NS3 interagit avec les protéines de la capsid externe : VP2 et VP5. Il est possible qu'elle forme un complexe avec ces deux protéines pour revêtir le core et finaliser l'assemblage du virus pour obtenir une particule mature (Figure 12).

L'interaction entre VP2 et l'extrémité C-ter de NS3 a été mise en évidence par la technique double-hybride en levure [139,141,185]. Des mutations au sein de cette extrémité ont révélé une séquence minimum au sein de NS3 (acides aminés 193 à 217), comme site d'interaction avec VP2 et démontré que les résidus 196-202 sont essentiels pour cette interaction [139]. De plus, abolir l'interaction NS3-VP2 entraîne une perte de localisation de toute particule nouvellement synthétisée à la membrane plasmique, restant alors localisée dans le cytoplasme [139]. Il est donc suggéré que VP2 est le ligand viral interagissant avec NS3 pour faciliter l'engagement du virus dans la machinerie de trafic membranaire de la cellule hôte [14,139].

L'interaction entre VP5 et NS3 a été mise en évidence par des études de co-purification d'affinité (*GST pull-down*) associées à des observations par immunofluorescence [140]. Cependant, la partie au sein de NS3 interagissant avec VP5 n'est pas connue. Il est supposé que l'interaction de NS3 avec VP5, qui elle-même interagit avec les radeaux lipidiques, constitue un échafaudage nécessaire à l'assemblage des nouvelles particules virales [140].

➤ Interaction de NS3 avec les protéines de transport

Des cribles double-hybride en levure ont permis d'identifier une interaction entre la chaîne légère de la calpactine (S100A10/p11) et NS3 [141]. La calpactine est un complexe protéique impliqué dans le transport des protéines et leurs ciblage à la membrane plasmique [146,187]. Elle est formée de deux chaînes légères (p11) et de deux chaînes lourdes (annexine II/p36) interagissant pour former un tétramère fonctionnel important pour le trafic de protéines et l'exocytose dépendante de calcium (Ca^{2+}) [188-191]. Il a été démontré que NS3 interagit avec la chaîne légère de la calpactine, en entre en compétition avec p36 pour sa liaison à p11, et fournit ainsi au virus un mécanisme lui permettant d'utiliser la machinerie d'export cellulaire pour la libération des virions matures [141]. En effet, l'inhibition de l'interaction entre NS3 et p11 conduit à l'assemblage de core ou de particule incomplète. De plus, une cartographie réalisée au sein de la partie N-ter de NS3 a révélé que les 13 premiers acides aminés de NS3 sont essentiels pour l'interaction avec p11. Étant donné que la calpactine interagit avec les 13 premiers acides aminés de NS3 qui sont à l'origine de sa différence avec NS3A, celle-ci n'interagit donc pas avec NS3A. On peut donc supposer que la libération du virus par bourgeonnement dans les cellules d'insecte n'implique pas la calpactine.

Du fait de son interaction avec la calpactine en sa partie N-ter et avec VP2 en sa partie C-ter, NS3 agit comme une molécule de pont facilitant l'engagement du virus dans la machinerie de trafic membranaire de la cellule hôte pour la libération des particules matures en transportant les virions à la membrane plasmique [139,146,192].

NS3 possède également au niveau des acides aminés 36 à 44 deux *late-domain* motifs : PPRY et PSAP.

Il a été décrit que NS3 interagit avec Tsg101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*), qui est un

composant de la protéine ESCRT-I (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) impliqué dans le trafic cellulaire et la libération de virus enveloppé, par l'intermédiaire de son motif PSAP [185,193]. Cette interaction est également conservée dans les cellules de drosophile où NS3 interagit avec l'orthologue de Tsg101 [185]. NS3A est également capable d'interagir avec Tsg101 [185]. PSAP est un motif de domaine tardif qui est similaire à ceux trouvés dans les virus enveloppés [139,185]. Une étude a démontré que la mutation des deux premiers acides aminés de ce motif (PSAP en GAAP) abolit l'interaction de NS3 avec Tsg101. Ce défaut d'interaction cause des défauts importants pour la libération des virions, les emprisonnant à la membrane plasmique. Néanmoins, aucune conséquence n'a été observée en amont sur le trafic des particules nouvellement synthétisées [139]. Réciproquement, l'extinction de Tsg101 par un ARN interférant spécifique inhibe la libération du BTV en n'ayant aucune incidence sur la réplication virale [185]. En résumé, NS3 interagit avec Tsg101 pour l'utiliser afin de permettre la scission des particules virales lors de leurs bourgeonnements à la membrane plasmique.

Le motif PPRY est homologue au motif PPXY présent dans de nombreux virus permettant à ces derniers d'interagir avec des ubiquitines ligases de type NEDD4 [185], qui possèdent, elles aussi, un rôle important dans le processus de bourgeonnement. Le motif PPRY ne permet pas à NS3 d'interagir avec Tsg101. Il a été décrit que la présence de l'arginine (R) rend le motif PPRY moins efficace que le motif PPXY pour le bourgeonnement des particules virales car il favoriserait le recrutement d'un antagoniste qui interférerait avec la machinerie de bourgeonnement cellulaire [185]. De plus, il a été supposé que la présence de l'arginine dans ce motif soit corrélée au fait que les orbivirus se répliquent dans les cellules d'insecte [185]. L'hypothèse qui est donc émise est que le BTV, par l'intermédiaire de NS3, module son affinité pour la machinerie ESCRT-I afin de pouvoir moduler la libération des particules virales soit par bourgeonnement soit par lyse des cellules infectées. Cependant, les mécanismes par lesquels NS3 régule la dynamique entre la libération du virus par bourgeonnement ou par rupture de la membrane plasmique ne sont pas encore bien saisis. La connaissance de ce mécanisme permettrait peut-être de mieux comprendre la différence d'infection observée entre les cellules de mammifère et les cellules d'insecte.

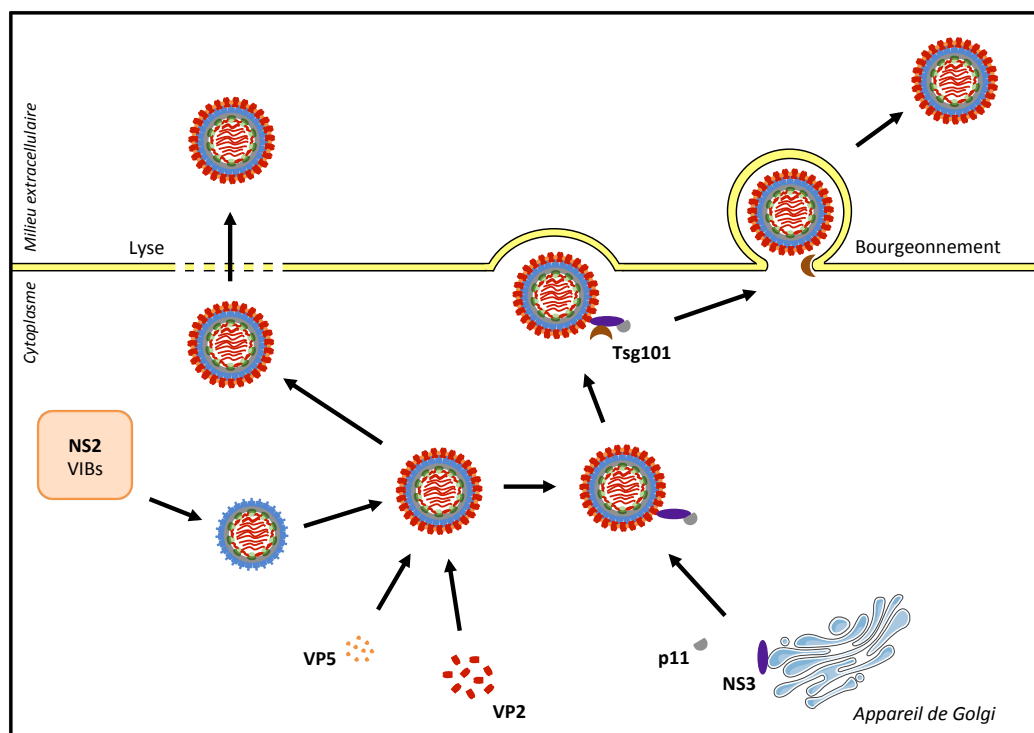


Figure 14 : Schéma représentant les mécanismes utilisés par NS3 pour faciliter la libération des particules de BTV.

NS3 est impliquée dans le trafic cellulaire des virions de BTV par l'intermédiaire de ses interactions avec p11 et VP2. NS3 permet ensuite l'engagement des virions dans la voie ESCRT-I grâce à son interaction avec Tsg101 pour faciliter la libération du virus par formation de vésicules à la membrane cytoplasmique. L'activité viroporine portée par NS3 permet quant à elle la libération des virions par lyse des cellules infectées.

b) La pathogénicité du BTV est liée à sa protéine NS3

Plusieurs études montrent que la virulence du BTV peut être fortement associée à sa protéine non structurale NS3. En effet, une étude comparée chez la souris entre la souche de BTV-8 de 2006 et une souche atténuée a révélé que les segments 10 (codant NS3/3A), 1, 2 et 6 sont importants pour la virulence associée au BTV [194]. Chez les ovins, ce sont de nouveaux les segments 2, 6 et 10 qui se sont montrés responsables du caractère virulent et de la pathogénicité du virus [195]. De plus, le remplacement d'une proline en position 24 par une leucine dans un système de génétique inverse a permis de démontrer que cette position est importante pour l'atténuation du virus chez la souris et qu'elle peut également influencer la vitesse de réplication dans les cellules ovines mais pas dans des cellules de culicoïde [196].

c) Impact de NS3 sur la voie des interférons de type I

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe de Dr. Damien Vitour avait étudié le déclenchement de la réponse innée, notamment IFN-I, en réponse à l'infection par le BTV ainsi que les mécanismes d'échappement associés.

L'infection par le BTV diminue fortement l'activité du promoteur IFN- β en réponse à la surexpression d'une forme constitutivement active de RIG-I (exprimant uniquement le domaine CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) de RIG-I), démontrant que le BTV interfère avec la voie RLR [154]. Par la suite, l'ensemble des protéines virales codées par le BTV a été testé et il s'est avéré que la protéine NS3 est la plus efficace pour inhiber l'activation du promoteur IFN- β [154]. De plus, cette capacité conférée à NS3 est conservée entre différents sérotypes/souches de BTV [154].

Afin d'identifier le lieu d'action de NS3 sur la cascade de signalisation, le promoteur IFN- β a été activé en surexprimant différents composants de la voie : MAVS (*Mitochondrial Antiviral Signaling*), TBK1 (*TANK Binding Kinase 1*), IKK ϵ (*Inductible I κ B Kinase*) et IRF3-5D (une forme constitutivement active d'IRF3). Par cette approche, l'équipe de Dr. Damien Vitour a montré que NS3 bloque l'induction de la synthèse d'IFN- α/β en bloquant la cascade de signalisation en aval de MAVS et en amont ou au niveau des IRF3 kinases (Figure 11) [154]. Plus récemment, il a été montré que NS3 interagit avec l'optineurine (OPTN), une protéine cellulaire associée à l'appareil de Golgi et qui régule le niveau de phosphorylation et donc d'activation de TBK1 [197]. Dans cette publication, il a été décrit que NS3 a la capacité de neutraliser l'activité d'OPTN en empêchant son interaction avec TBK1 conduisant ainsi au blocage de son activation.

Un des objectifs de ma thèse visait à d'étudier l'impact du BTV sur la voie MAPK/ERK, voie ciblée par de nombreux virus. C'est pourquoi, cette voie de signalisation cellulaire sera détaillée dans la partie suivante.

II. Les voies de signalisation MAP-Kinases

Les protéines MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) constituent une famille de sérine/thréonine kinases très conservée de la levure à l'homme. Elles activent des cascades de signalisation qui sont impliquées dans des processus cellulaires essentiels tels que la prolifération, la différenciation, la survie et l'apoptose. L'ensemble de ces voies est régulé par une série de phosphorylations se produisant suite à un stimulus extracellulaire, tels que des facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires, un stress environnemental, des hormones et des infections microbiennes [198,199]. Le ligand va se lier à son récepteur tyrosine kinase et activer 3 niveaux de kinases. Les premières kinases activées sont les MAPK kinase kinases (MAPKKK ou MAP3K) qui activent les MAPK kinases (MAPKK ou MAP2K) qui pour finir activent à leur tour les MAPK. A ce jour, il existe 7 voies MAPK décrites chez les mammifères, 4 voies dites « classiques » et 3 voies dites « atypiques ».

A. Généralité sur les voies

1. Les voies de signalisation MAPK « classiques »

Les voies de signalisation MAPK dites « classiques » possèdent toutes au niveau de leur boucle d'activation un motif thréonine (T)-X-tyrosine (Y) (où X peut être n'importe quel acide aminé) qui est responsable de l'activation de la voie en induisant une phosphorylation des résidus T et Y par les kinases MAP2K (Tableau 2).

- **La voie ERK1/2 ou MAPK/ERK**

La voie ERK1/2 pour *Extracellular signal-Regulate Kinases 1 and 2* plus communément nommée MAPK/ERK est actuellement la mieux caractérisée et la plus étudiée. Cette voie fait l'objet de nos études et sera développée plus en détail dans les parties suivantes (voir B page 66).

- **La voie p38**

La voie MAP kinase p38 est décrite sous 4 isoformes α , β , γ et δ codés par 4 gènes différents [200-202]. Les p38 sont impliquées dans l'apoptose, la prolifération, la différenciation, la survie, le développement, l'inflammation cellulaire et d'autres réponses au stress [203]. Les p38 sont activées par phosphorylation des résidus T180 et Y182 au sein d'un motif T-G-Y (G = glycine) [204]. L'activation des voies de signalisation p38 induit l'activation de nombreux substrats à la fois cytoplasmique et nucléaire [205]. Les p38 peuvent phosphoryler le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (ou EGFR pour *Epidermal Growth Factor Receptor*) pour induire son internalisation [205].

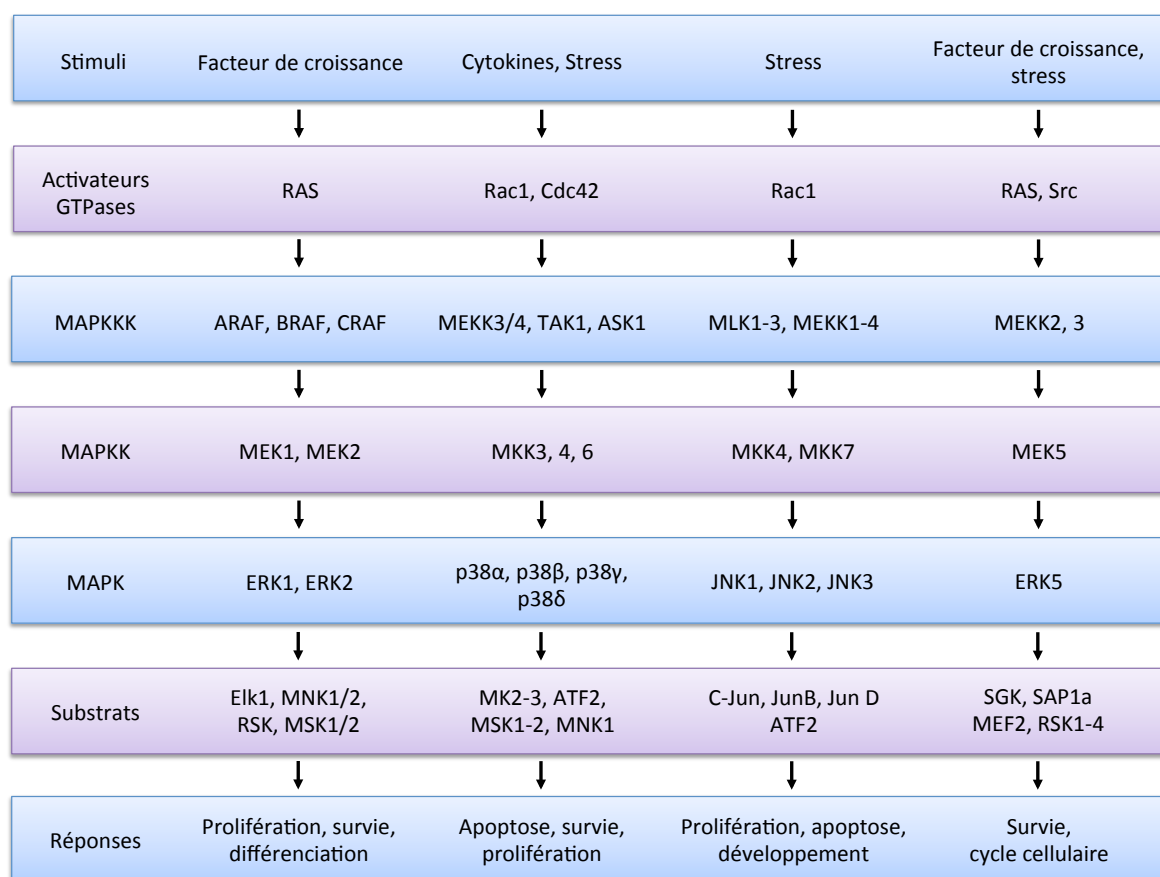
- **La voie JNK**

La voie JNK pour *c-Jun N-terminal Kinase* comprend 3 isoformes : JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9) et JNK3 (MAPK10) [206]. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que l'apoptose, l'inflammation, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire [207-209]. Les JNK sont activées par phosphorylation des résidus T183 et Y185 au sein d'un motif T-P-Y (P = proline) [209]. Les facteurs de transcription nucléaire (comme ATF-2 pour *Activating Transcription Factor 2*) et les protéines JUN (c-Jun, JunB, JunD) sont activés par les JNK [210,211].

- **La voie ERK5**

La voie ERK5 également appelée BMK1 pour *Big MAP Kinase-1* existe sous 3 formes épissées : ERK5a, ERK5b et ERK5c [212]. Son nom provient du fait qu'elle a une masse moléculaire deux fois supérieure aux MAPKs « classiques ». Les ERK5 sont activées par la phosphorylation des résidus T et Y au sein d'un motif T-E-Y [213,214]. ERK5 régule la survie et la prolifération cellulaire en stimulant l'expression de la cycline D1 [215] et active la famille des protéines kinases RSK (*Ribosomal S6 Kinase*) [216].

Tableau 2 : Caractéristiques principales des 4 voies de signalisation MAPK dites « classiques ».



2. Les voies de signalisation MAPK « atypiques »

On dénombre trois voies de signalisation MAPK dites « atypiques » (Tableau 3).

- **La voie ERK3/4**

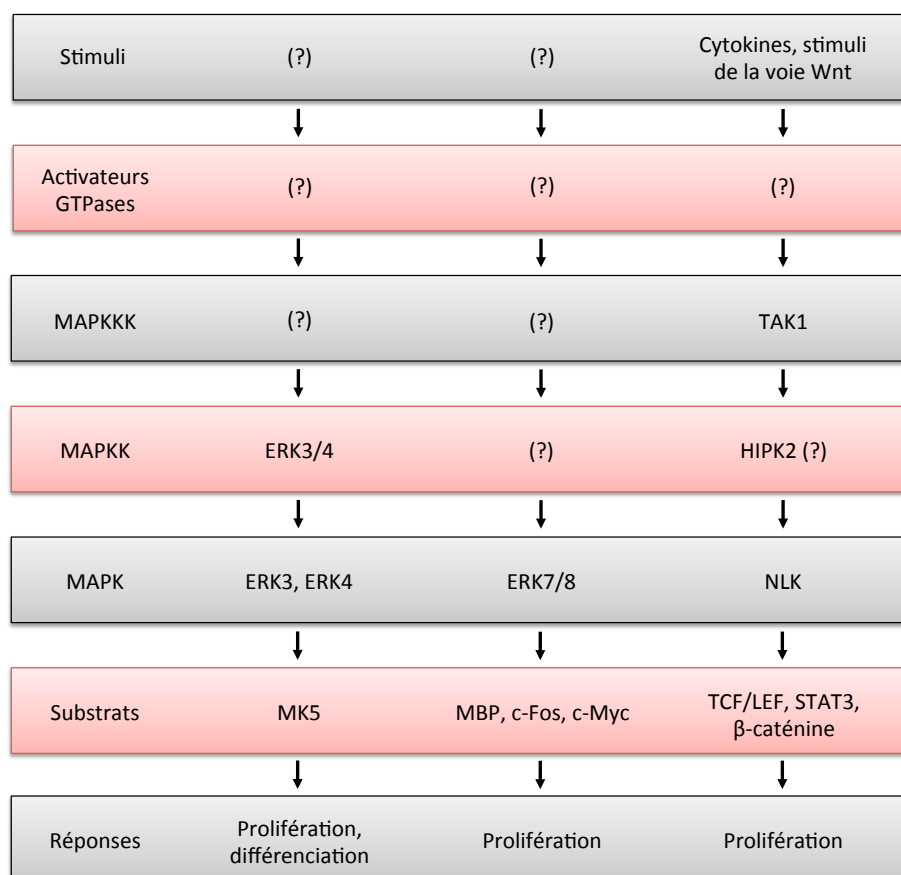
La voie ERK3/4 (*Extracellular signal-Regulate Kinases 3 and 4*) est considérée comme une voie MAPK « atypique » parce que le motif T-X-Y normalement présent au niveau de la boucle d'activation est remplacé par un motif S-E-G [217]. Le rôle biologique de ERK4 reste pour le moment inconnu, contrairement à ERK3 qui semble être impliquée dans la prolifération, la différenciation cellulaire, la progression du cycle cellulaire et dans l'embryogenèse [218].

- **La voie ERK7/8**

La voie ERK7/8 (*Extracellular signal-Regulate Kinases 7 and 8*) est considérée comme une voie MAPK « atypique » parce que les kinases ERK7 et ERK8 contiennent une extrémité C-ter qui n'est pas présente dans les MAPK dites « classiques » [217]. Cette extrémité pourrait leur servir dans leur localisation subcellulaire [219]. Un motif T-E-Y est présent au niveau de la boucle d'activation suggérant qu'une MAP2K dite « classique » pourrait intervenir [217]. *In vitro* trois substrats des MAPK « classiques » ont été identifiés pour ERK7 (MBP (*Myelin Basic Protein*), c-Fos et c-Myc) et un substrat a été identifié pour ERK8 (MBP) [220,221]. Ces deux kinases possèdent des fonctions importantes dans la prolifération cellulaire [220] et dans la réponse aux œstrogènes [222] et aux glucocorticoïdes [223].

- **La voie NLK**

La voie NLK pour *Nemo-Like Kinase* est considérée comme une voie MAPK « atypique » parce que la kinase NLK possède des extrémités N-ter et C-ter qui ne sont pas présentes chez les MAPK dites « classiques » [217]. La kinase NLK possède plusieurs substrats tels que les facteurs de transcription TCF/LEF (*T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor*) [224] ainsi que STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription protein 3*) [225]. Elle peut également réguler positivement ou négativement la voie de la β -caténine [224,226].

Tableau 3 : Caractéristiques principales des 3 voies de signalisation MAPK dites « atypiques ».

B. La voie de signalisation MAPK/ERK (ou ERK1/2)

La voie de signalisation MAPK/ERK fut la première voie de signalisation MAPK caractérisée (Figure 15). Elle a été mise en évidence en 1990 par Boulton et ses collaborateurs qui s'intéressaient à la réponse cellulaire suite à la phosphorylation d'un récepteur tyrosine kinase qui entraîne l'activation de protéine kinase à sérine/thréonine [227]. La voie MAPK/ERK est hautement conservée et reflète son importance dans plusieurs processus cellulaires. Elle permet de réguler différents acteurs qui sont impliqués dans la différenciation, la prolifération, la survie, la migration, la sénescence et l'apoptose cellulaire.

1. Mécanisme d'activation de la voie

- **Le récepteur à l'EGF : l'EGFR**

La voie de signalisation MAPK/ERK est activée en réponse à des stimuli extracellulaires tels que le stress, des facteurs de croissance ou des cytokines. La liaison de facteurs de croissance, comme l'EGF, à son récepteur l'EGFR [228,229] active la voie en induisant une cascade de phosphorylations. L'EGFR appartient à une famille de récepteurs à protéines tyrosines kinases (PTKR pour *Protein-Tyrosine Kinase Receptor*) qui comprend le facteur de croissance de l'insuline (IGF pour *Insulin Growth Factor*) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF pour *Platelet Derived Growth Factor*) qui peuvent également activer la voie. Ce type de récepteur contient un domaine N-ter de liaison au ligand extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine C-ter cytosolique avec une activité de protéine tyrosine kinase [230]. Lors de la liaison avec un facteur de croissance comme l'EGF, le récepteur subit une dimérisation et se phosphoryle au niveau des résidus tyrosines présents dans le domaine cytosolique. Cette phosphorylation est catalysée par la kinase intrinsèque à ce domaine [231] et permet de créer des domaines pour la liaison à des protéines contenant des domaines SH2 (*Src-Homology 2 domains*).

- **GRB2 : la protéine adaptatrice de l'EGFR**

A l'état activé, le récepteur recrute la protéine GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*) qui est connue pour être l'adaptateur cytosolique du récepteur à l'EGF. GRB2 contient un domaine SH2 central flanqué par deux domaines SH3 (*Src-Homology 3 domains*). Les domaines SH (*Src Homology*) ont été initialement décrits pour les protéines tyrosines kinases de la famille SRC et se comptent au nombre de trois : SH1 contient l'activité catalytique des tyrosines kinases et les domaines SH2 et SH3 sont des motifs d'interaction protéine-protéine. SH2 reconnaît les motifs tyrosines phosphorylés et SH3 reconnaît les régions riches en proline. L'association de GRB2 à l'EGFR permet à GRB2, par l'intermédiaire de ses domaines SH3 [229], d'interagir avec les régions riches en proline de la molécule SOS (*Sun-Of-Sevenless*) [232].

- **La protéine RAS**

Le recrutement de SOS au niveau de la membrane plasmique lui permet d'interagir avec la protéine RAS (HRAS, NRAS, KRAS 4A et 4B pour H : Harvey, N : Neuroblastoma et K : Kirsten respectivement) [228,229,232]. Les protéines RAS sont des petites GTPases qui font partie de la famille des protéines G monomériques. Elles sont activées par les récepteurs membranaires des facteurs de croissance et transmettent les signaux de la surface cellulaire à une variété d'effecteurs, par activation de kinases [233]. Les protéines RAS sont des commutateurs moléculaires qui varient entre des formes inactives, liées au GDP (*Guanosine Diphosphate*), et des formes actives, liées au GTP (*Guanosine Triphosphate*). La conversion de l'état inactif à l'état actif implique les facteurs d'échange guanidine (GEF pour *Guanine nucleotide Exchange Factor*) qui stimulent l'échange du GDP en GTP. SOS est un GEF qui régule le cycle du GTP/GDP de RAS et favorise la formation de RAS activée (RAS-GTP), tandis que la protéine qui active l'activité GTPasique de RAS (GAP pour *GTPase-Activating Proteins*) stimule l'hydrolyse du GTP, résultant dans la formation de la forme inactive de RAS (RAS-GDP). C'est uniquement lorsque RAS est liée au GTP que le domaine effecteur active les molécules en aval [228,229].

- **Les protéines MAP3K : ARAF, BRAF, CRAF**

Suite à l'activation de RAS par SOS, RAS recrute l'une des protéines kinases RAF (ARAF, BRAF, CRAF/RAF-1) (= MAP3K), qui sont des sérine/thréonine kinases, au niveau de la membrane plasmique [228,229]. CRAF fut la première kinase de cette famille à être découverte dans des cellules humaines et dans des cellules de rongeurs [234-237]. De ce fait, elle fut la première à être étudiée pour son implication dans l'activation de la voie MAPK/ERK. Puis les kinases ARAF [238-241] et BRAF [242] ont été découvertes peu de temps après. Les kinases RAF possèdent trois régions conservées : CR1, CR2 et CR3. La région CR1 en N-ter possède deux domaines de liaison à RAS : le domaine de liaison à RAS (RBD pour *RAS Binding Domain*) et un domaine riche en cystéine qui permet de stabiliser l'interaction RAS-RAF à la membrane plasmique (CRD pour *Cysteine-Rich Domain*). Le domaine CR2 est une partie riche en résidus sérine et thréonine et le domaine CR3 en C-ter correspond au domaine kinase

[243]. Il a été démontré que BRAF est l'activateur principal des kinases MEK1/MEK2 (*Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2*) [244]. Les caractéristiques ainsi que les mécanismes d'activation de BRAF seront détaillés dans la partie II.C. (page 76) de ce manuscrit.

- **Les protéines MAP2K : MEK1, MEK2**

Une fois les protéines RAF phosphorylées, celles-ci activent les protéines kinases MEK1/MEK2 (= MAP2K) qui sont des tyrosines/thréonines kinases. Ce sont les seules MAP2K décrites actuellement pour l'activation de la voie. Elles possèdent en N-ter un domaine de liaison aux protéines ERK1/2 [245] ainsi qu'une séquence d'exclusion nucléaire (NES pour *Nuclear Export Signal*) [246]. Elles possèdent également toutes deux un domaine catalytique riche en proline qui est responsable de leur activation par RAF [247].

- **Les protéines MAPK : ERK1, ERK2**

Une fois les MAP2K phosphorylées, elles activent les protéines kinases ERK1/ERK2 (= MAPK) qui sont leurs seules cibles connues [228,229]. Dans les cellules non stimulées, l'interaction de MEK1/2 avec ERK1/2 permet la localisation cytoplasmique de ERK1/2. Lors de l'activation de la voie MAPK/ERK, la phosphorylation de ERK1/2 les dissocie de MEK1/2 et permet ainsi leur localisation nucléaire. MEK1/2 possèdent donc un double effet sur ERK1/2 : leur activation et leur séquestration dans le cytoplasme [245]. Les protéines ERK1/2 sont des sérines/thréonines kinases possédant des substrats nucléaires et cytoplasmiques [228,229]. Elles sont activées par phosphorylation des résidus T185 et Y187 au sein d'un motif T-E-Y. Les protéines ERK1/2 phosphorylées forment des dimères qui vont permettre l'activation des facteurs de traduction comme eIF4E (*Eukaryotic translation Initiation Factor 4E*) ou la petite sous-unité ribosomale S6 (Kinase de la sous-unité ribosomale 40S). Ces dimères de protéines ERK phosphorylées peuvent également migrer dans le noyau pour phosphoryler des facteurs de transcription comprenant Elk-1 [228,229], dont les produits sont majoritairement impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

a) A la membrane plasmique : importance de la protéine KSR

La cascade de signalisation ERK1/2 présente au niveau de la membrane plasmique implique la protéine KSR (*Kinase Suppressor of Ras*). Des cribles génétiques réalisés chez la *Drosophila* [248] et *C. elegans* [249,250] avaient permis pour la première fois de décrire KSR comme un régulateur positif de la voie MAPK/ERK. La kinase KSR est une protéine multidomaine qui lie les kinases RAF, MEK1/2 et ERK1/2. Dans les cellules au repos, KSR est séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3. En réponse à un signal mitogénique, comme un facteur de croissance, KSR est déphosphorylée (S392) et transloquée vers la membrane plasmique pour activer la voie en interagissant avec RAF, MEK1/2 et ERK1/2 [251,252].

b) A l'appareil de Golgi : importance de la protéine Sef

Des études sur l'activation de la protéine RAS au niveau des membranes internes ont permis de démontrer que lors de la stimulation avec un facteur de croissance, RAS devient actif à la fois à la membrane plasmique et à l'appareil de Golgi lorsqu'elle est palmitoylée (ajout d'un acide palmitique sur certains résidus cystéines), révélant ainsi une signalisation ERK1/2 au niveau de ce compartiment cellulaire [253]. Cependant, la cinétique d'activation au niveau des deux compartiments est différente. L'activation au niveau de la membrane plasmique est rapide (entre 1 et 10 minutes (min)) et transitoire alors que l'activation au niveau de l'appareil de Golgi est retardée (supérieure à 20 min) et soutenue [229].

La cascade de signalisation ERK1/2 présente au niveau de l'appareil de Golgi implique la protéine d'échafaudage Sef qui lie uniquement les kinases MEK activées. Avant d'avoir été découverte comme une protéine impliquée dans la voie MAPK/ERK [254], Sef a été décrite comme un régulateur négatif de la signalisation du facteur de croissance des fibroblastes [255,256]. L'activation de la voie MAPK/ERK à l'appareil de Golgi implique la phospholipase gamma (PLC γ), activée par Src en aval de l'EGFR, produisant des diacylglycérols (DAG) et induisant un apport de calcium via IP3 (inositol trisphosphate). DAG ainsi que le calcium permettent l'activation de la protéine RasGRP1 (*Ras Guanyl Releasing Protein 1*) et sa migration vers l'appareil de Golgi pour activer RAS puis RAF [257,258]. Il va s'en suivre la même cascade de phosphorylation que celle présente au niveau de la membrane plasmique

(RAF, MEK1/2, ERK1/2). Cependant, Sef lie les protéines MEK1/2 phosphorylées et ce complexe emprisonne les kinases ERK1/2 phosphorylées au compartiment empêchant leur translocation dans le noyau et de ce fait leur interaction avec les facteurs de transcription nucléaire comme Elk-1 [228,229]. Il a été démontré que lorsque les kinases ERK1/2 phosphorylées sont associées à Sef, elles peuvent phosphoryler RSK2 permettant l'activation des facteurs de traduction [254].

c) Aux endosomes : importance de la protéine MP1

Comme les endosomes sont des organites dérivant de la membrane plasmique, ceux-ci sont connus pour internaliser les PTKRs et de ce fait posséder une signalisation MAPK/ERK [228]. Des études de fractionnement subcellulaire ont permis de différencier GRB2, SOS, RAS et phospho-CRAF au niveau des endosomes après stimulation par l'EGF ou par l'insuline révélant ainsi une signalisation ERK au niveau de ce compartiment cellulaire [259,260]. De plus, il a été démontré que des cellules déficientes en endocytose ne sont pas capables d'activer la voie MAPK/ERK en aval des PTKRs laissant supposer que l'endocytose est importante pour stimuler la voie et que ceci ne passe pas par une simple régulation du récepteur [261,262].

La cascade de signalisation ERK1/2 présente au niveau des endosomes implique la protéine d'échafaudage MP1 (*MEK Partner 1*). MP1 a été identifiée pour la première fois dans des cribles double-hybride en levure en tant que partenaire de la protéine kinase MEK1 [263]. Il a été décrit que MP1 lie spécifiquement les kinases MEK1 et ERK1 permettant ainsi la phosphorylation de ERK1 par MEK1 [263]. De plus, MP1 est impliquée dans la voie MAPK/ERK uniquement lorsque celle-ci se lie à P14 présente au niveau de la face cytoplasmique des endosomes précoces [264]. L'utilisation de siARNs spécifiques de P14 a permis de mettre en évidence que le complexe P14/MP1 est nécessaire à l'activation de la voie au niveau des endosomes 10 à 30 min après stimulation à l'EGF [264]. De plus, l'activation de la voie au niveau de ce compartiment cellulaire est soutenue [265,266].

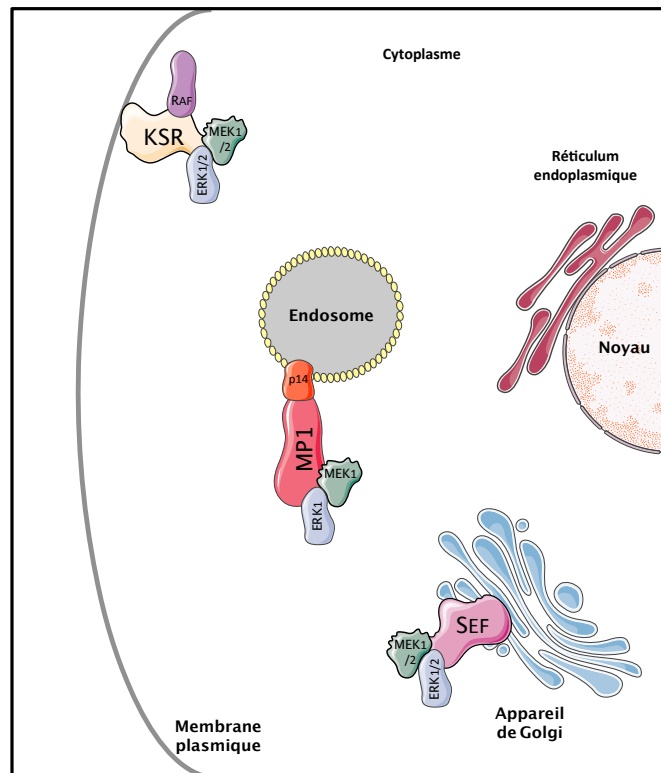


Figure 16 : Les trois principales protéines d'échafaudage impliquées dans la compartimentation de la voie MAPK/ERK : KSR, Sef et MP1.

KSR fixe RAF, MEK1/2 et ERK1/2 pour l'activation de la voie au niveau de la membrane plasmique, Sef fixe MEK1/2 et ERK1/2 pour l'activation de la voie au niveau de l'appareil de Golgi et MP1 fixe MEK1 et ERK1 pour l'activation de la voie au niveau des endosomes.

En plus de ces 3 principales protéines d'échafaudage, d'autres sont également décrites dans leur implication pour la compartimentation de la voie. La β -arrestine 2 fixe CRAF, MEK1 et ERK2 pour l'activation de la voie au niveau des endosomes, IQGAP1 (*IQ motif-containing GTPase Activating Protein 1*) fixe RAF, MEK1/2 et ERK1/2 afin de favoriser la polymérisation de l'actine et la migration cellulaire et la paxiline fixe RAF1 et ERK1/2 aux sites d'adhésions focales du cytosquelette [267].

3. Répercussion de l'activation de la voie MAPK/ERK sur la cellule

Les kinases ERK1/2, lorsqu'elles sont activées, régulent de multiples processus tels que le cycle cellulaire et la traduction (Figure 17).

- **Régulations du cycle cellulaire**

Au niveau du cycle cellulaire, les protéines kinases ERK1/2 sont impliquées dans le contrôle de la prolifération, la différenciation, la survie, l'apoptose et la sénescence.

Les kinases ERK1/2 phosphorylées migrent dans le noyau pour activer un certain nombre de facteur de transcription. Cette étape est rendue possible par l'intermédiaire de la phosphorylation d'une séquence de translocation nucléaire (NTS) présente sur la séquence des kinases, qui leur permet d'interagir avec les protéines importatrices nucléaires et ainsi d'être transférées dans le noyau via les pores nucléaires [217]. Une fois dans le noyau, ERK1/2 induit la phosphorylation du facteur de transcription Elk-1 qui est impliqué dans l'expression de gènes précoces [217]. ERK1/2 activent également les protéines kinases MSK1/2 (pour *Mitogen- and Stress-activated Kinase 1 and 2*) qui elles-mêmes régulent les facteurs de transcription nucléaire CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*), ATF1 (*Activating Transcription Factor 1*) et STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). Les MSK1/2 permettent également de remodeler la chromatine en jouant un rôle de médiateur de la réponse nucléosomale en phosphorylant l'histone H3 [217,268].

Les kinases ERK1/2 sont également impliquées dans la prolifération cellulaire en interagissant directement avec les protéines c-Fos et c-Jun pour les maintenir sous leurs formes phosphorylées, leur permettant ainsi de former des complexes AP-1 (*Activator protein 1*) transcriptionnellement actifs [269]. Ces complexes sont nécessaires à l'expression de la cycline D1 [270] qui régule le cycle cellulaire en permettant la progression de la phase G1 à S en interagissant avec les kinases dépendantes de cyclines (CDK pour *Cyclin Dependent Kinase*) [217] et en inactivant les gènes antiprolifératifs [271].

Les protéines ERK1/2 sont également impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire [271] en stabilisant le facteur de transcription c-Myc afin d'augmenter son activité transcriptionnelle [272,273]. L'activation de la voie MAPK/ERK favorise aussi la survie cellulaire car elle possède des substrats permettant de réprimer l'expression ou l'activité des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (pour *B-cell lymphoma 2* (BAD et Bim-1)) et d'augmenter l'expression des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-KL et Mcl-1) pour empêcher la dépolarisation mitochondriale [217,244]. Elle entraîne également la phosphorylation de la caspase 9 induisant son inactivation [244] et l'inhibition de l'apoptose par les récepteurs Fas, TNF (*Tumor Necrosis Factor*) et TRAIL (*Tumor-necrosis-factor Related*

Apoptosis Inducing Ligand) [274]. L'activation de la voie MAPK/ERK peut aussi participer à l'induction de la sénescence cellulaire.

- **Traduction des protéines cellulaires**

L'activation des MNK1/2 (*Mitogen-activated protein kinases-interacting kinases 1 and 2*) par ERK1/2 est impliquée dans l'activation des facteurs de traduction qui permettent de contrôler la croissance et la prolifération cellulaire [275]. Les MNK1/2 se fixent au facteur d'initiation de la traduction eIF4G et phosphorylent eIF4E [276,277]. Ce dernier appartient au complexe de préinitiation de la traduction permettant de recruter la petite sous-unité ribosomique 40S au niveau de la structure en coiffe à l'extrémité 5' des ARNm. Les MNK1/2 peuvent également contrôler des facteurs d'épissage et certaines protéines se lient à l'ARNm (hnRNPA1 pour *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1* et PSF pour *Polypyrimidine tract-binding protein-associated Splicing Factor*) [217].

Les protéines ERK1/2 activent également les kinases RSK qui se composent de deux sous-familles : p90RSK composée de 4 isoformes (RSK1 à 4) et p70RSK (kinase S6), qui toutes deux phosphorylent la protéine S6 présente dans la petite sous-unité 40S du ribosome impliquée dans la traduction cellulaire. La phosphorylation de S6 permet de favoriser la formation du complexe de préinitiation de la traduction et ainsi augmenter la traduction dépendante de la coiffe [217]. Les p90RSK phosphorylent également le facteur d'élongation de la traduction eEF2 (Eucaryotic Elongation Factor2) [278] et le facteur d'initiation de la traduction eIF4B (*Eukaryotic translation Initiation Factor 4B*) [279] permettant de favoriser la synthèse des protéines.

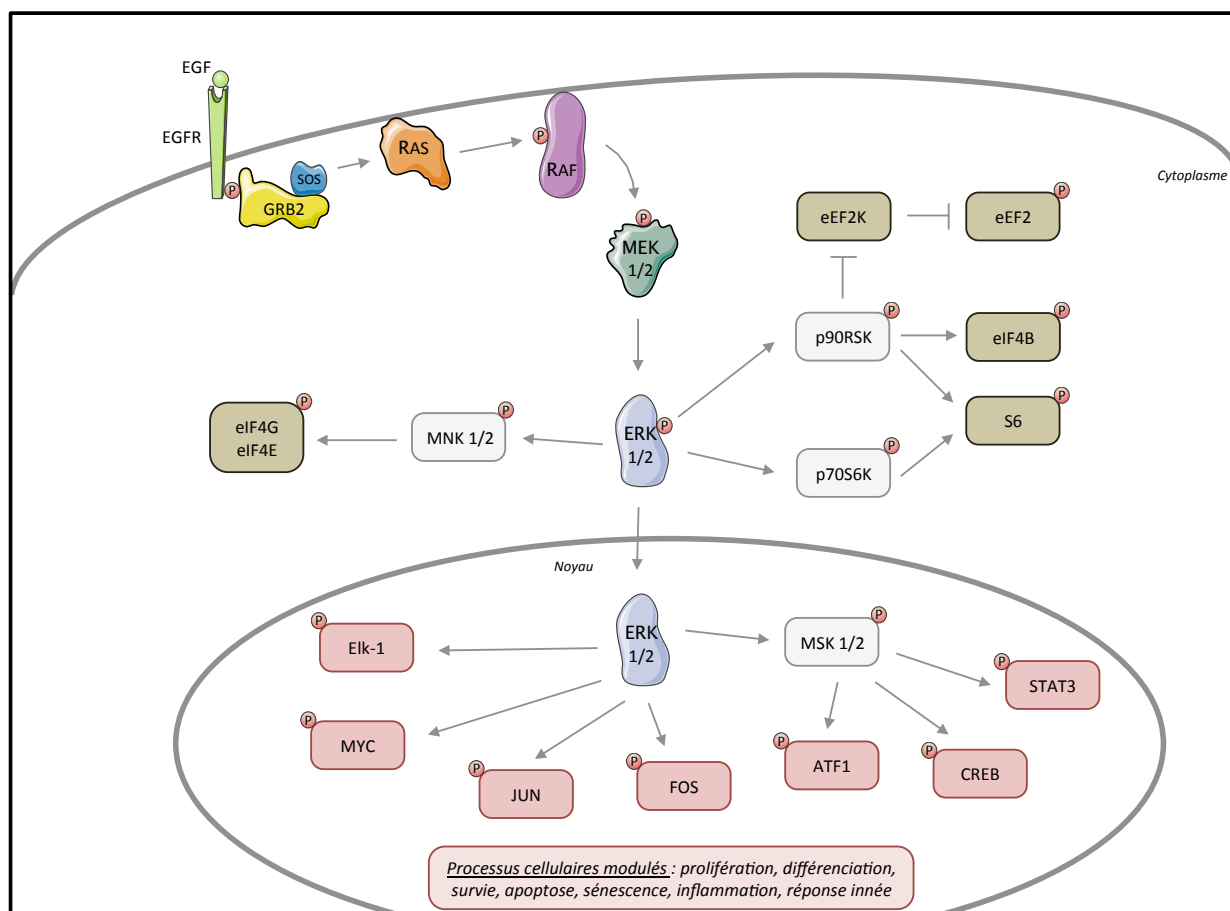


Figure 17 : Les différents substrats (cytoplasmiques et nucléaires) que les kinases ERK1/2 activent suite à l'induction de la voie de signalisation MAPK/ERK.

Les facteurs de transcription (rouge), les kinases (gris) et les facteurs de traduction (kaki) activés par les protéines kinases ERK1/2 sont représentés.

C. La protéine kinase BRAF

- **Structure de BRAF**

Comme il a été mentionné dans la partie II.B.1 (page 68) de ce manuscrit de thèse, la protéine kinase BRAF possède trois domaines conservés : un domaine CR1 regroupant deux domaines de liaison à RAS (RBD et CRD), un domaine CR2 étant une partie riche en résidus sérines et thréonines dont leurs phosphorylations sont nécessaires à l'activation de BRAF et un domaine CR3 contenant le domaine kinase. En plus de ces domaines, BRAF possède une longue région N-ter qui est chargée négativement en amont du domaine CR1 qui lui est spécifique. Au sein de cette partie N-ter, BRAF possède un domaine BRS (pour *BRAF-Specific*) (Figure 18).

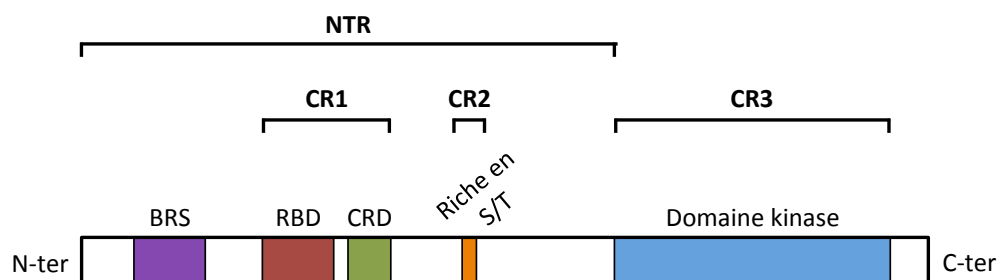


Figure 18 : Représentation schématique de la protéine kinase BRAF.

BRAF possède trois domaines qui sont conservés au sein de toutes les protéines RAF. Le domaine CR1 composé de deux domaines de liaison à la protéine RAS : RBD qui correspond au domaine de liaison à RAS et CRD qui est un domaine riche en résidu cystéine qui permet de favoriser la liaison de BRAF à RAS à la membrane plasmique. Le domaine CR2 qui est une partie riche en résidus sérines et thréonines et le domaine CR3 correspondant au domaine kinase. BRAF possède également dans sa partie N-ter un domaine qui lui est spécifique : le domaine BRS. NTR pour *N-terminal regulatory regions*.

- **Cycle d'activation de BRAF**

BRAF sous forme inactive est séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3 qui se lie à la partie CR2 de BRAF au niveau des résidus sérine permettant sa phosphorylation. Lorsque RAS est activée, c'est-à-dire liée au GTP, BRAF va se relocaliser du cytosol à la membrane plasmique et va s'associer à RAS par sa région RBD au sein du domaine CR1 [280]. Cette association conduit à la déphosphorylation d'un résidu situé en N-ter du domaine kinase entraînant la libération de la protéine 14-3-3 qui séquestre BRAF dans le cytoplasme et permet de libérer le domaine kinase. Puis, le domaine CRD stabilise l'interaction RAS-BRAF au niveau de la membrane plasmique [280]. Il s'en suit une phosphorylation de BRAF dans sa région N-ter par les kinases de la famille SRC et la caséine kinase 2 (CK2) conduisant à une activation « partielle » de BRAF [243]. L'activation « totale » de BRAF est dépendante de son homodimérisation ou de son hétérodimérisation avec d'autres protéines RAF (BRAF ou CRAF) [281-283]. La première évidence que RAF s'active par dimérisation vient de l'observation que l'oligomérisation artificielle de RAF stimule son activation [284,285]. Il a été démontré que RAS-GTP favorise la formation de complexe BRAF-CRAF [283,286]. Les homodimères respectifs sont également capables de se former mais leur activité est inférieure à celle des hétérodimères [286]. L'augmentation de la concentration de protéines RAF à la membrane plasmique par l'intermédiaire de leur association avec RAS ainsi que la présence des protéines 14-3-3 au niveau des extrémités C-ter de RAF favorisent la

dimérisation de deux protéines RAF, via leurs domaines kinases, lorsqu'ils se trouvent côte à côte, et ainsi leur transactivation [286,287]. Une fois dimérisée et ainsi activée, BRAF va phosphoryler les protéines kinases MEK1/2 qui vont activer à leur tour les kinases ERK1/2. Afin d'effectuer un retour à l'état basal, les résidus phosphorylés permettant l'activation de BRAF doivent être déphosphorylés [243]. Pour cela, les protéines ERK1/2 induisent une boucle de rétro-contrôle négatif permettant la phosphorylation de certains sites inhibiteurs au sein de BRAF [288,289]. Ceci va conduire en l'inhibition de l'interaction de BRAF avec RAS et rompre les hétérodimères BRAF-CRAF ou les homodimères BRAF-BRAF [286,289]. Les sites ciblés par ERK1/2 vont ensuite être déphosphorylés par la protéine phosphatase PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) afin que les protéines BRAF soient recyclées pour être disponibles pour un nouveau cycle d'activation (Figure 19) [288].

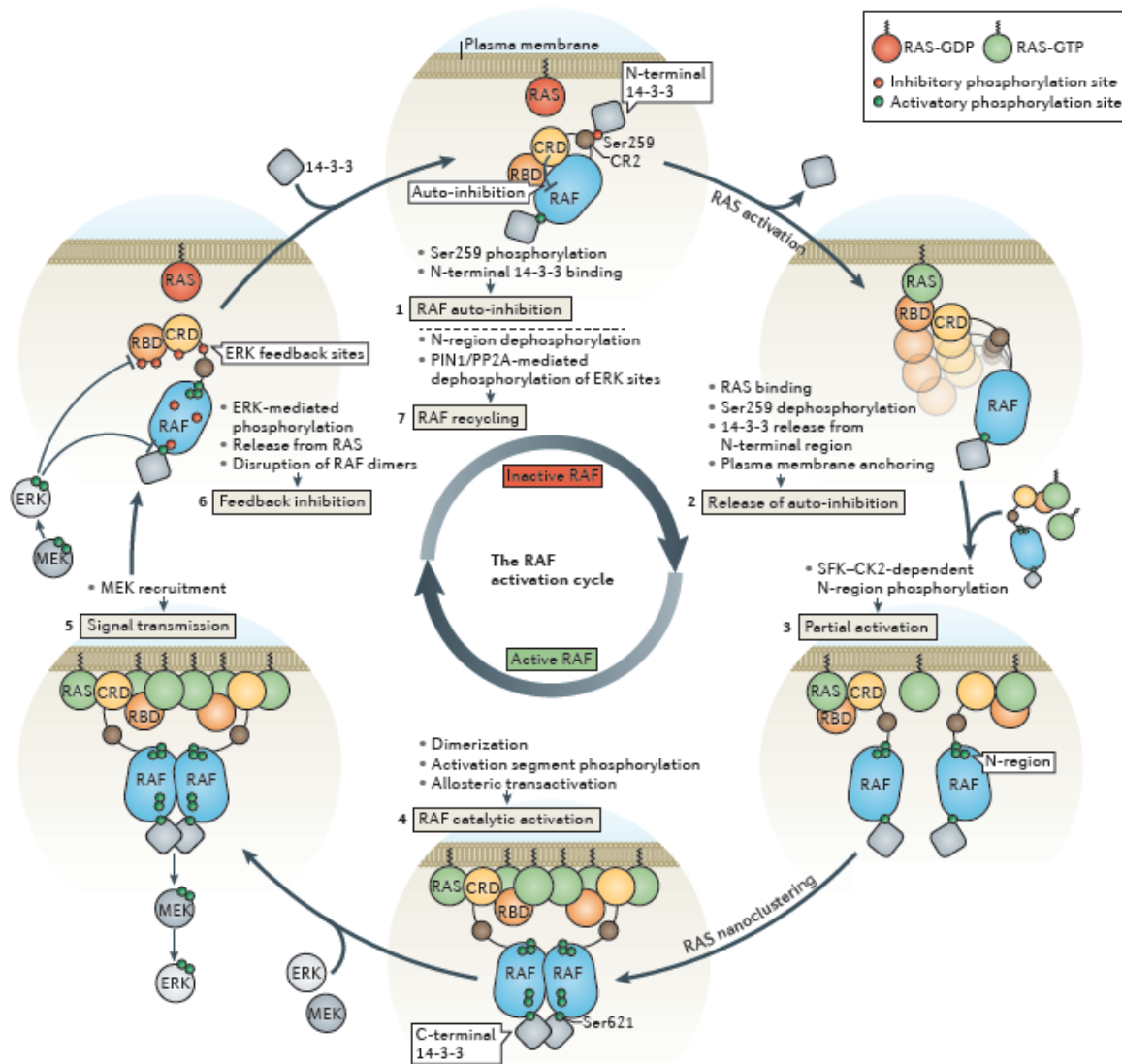


Figure 19 : Cycle d'activation de BRAF.

(1) L'auto-inhibition de BRAF stabilisée par la protéine 14-3-3 en N-ter. (2) La stimulation par un facteur de croissance permet à BRAF d'être recrutée à la membrane plasmique en interagissant avec RAS-GTP par l'intermédiaire de son domaine RBD. Cette interaction permet de lever l'auto-inhibition de BRAF en inhibant sa liaison avec la protéine 14-3-3 et libère ainsi le domaine kinase de BRAF. (3) Le domaine CRD de BRAF permet de stabiliser l'interaction BRAF-RAS à la membrane plasmique. Il s'en suit une activation partielle de BRAF par phosphorylation des résidus présents en N-ter par la famille de protéine kinase SRC (SFKs) et par la caséine kinase 2 (CK2). (4) L'augmentation de la concentration de protéines RAF (BRAF ou CRAF) à la membrane plasmique et la présence de la protéine 14-3-3 à l'extrémité C-ter des protéines RAF, contribuent à la dimérisation ou l'hétérodimérisation de BRAF. (5) La dimérisation de BRAF au niveau de son domaine kinase conduit à son activation permettant ainsi de recruter MEK1/2 et de les phosphoryler. Ces dernières pourront à leur tour activer les protéines kinases ERK1/2. (6) Il va s'en suivre une boucle de rétro-contrôle négatif exercée par les protéines ERK induisant la phosphorylation de plusieurs sites inhibiteurs au sein de BRAF. Ceci va conduire à la perte d'interaction avec la protéine RAS et la rupture des dimères de RAF. (7) Simultanément à la boucle de rétro-contrôle négatif, il se produit la déphosphorylation des sites permettant l'activation de BRAF, permettant de recycler les protéines BRAF pour un cycle ultérieur d'activation.

Extrait de Lavoie, H & Therrien, M, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015 [243].

- **Activation de BRAF par KSR**

Une autre protéine peut intervenir dans l'activation de BRAF : la protéine kinase KSR qui existe sous deux isoformes (KSR1 et KSR2). Une étude a révélé que la surexpression de KSR est suffisante pour induire l'activation de BRAF sans nécessiter l'activation de RAS [290]. L'hypothèse émise quant à l'activation de BRAF par KSR est que celle-ci serait dépendante de l'interaction KSR-MEK [290] car lorsque l'interaction KSR-MEK est abolie, l'activation de BRAF par KSR n'a plus lieu [291]. Le modèle qui prédomine quant à la liaison de MEK à KSR qui confère à KSR la capacité d'activer BRAF et *in fine* MEK est le suivant : MEK se lie au domaine kinase de KSR permettant à KSR de transactiver BRAF par dimérisation de leurs domaines kinases. Ainsi, BRAF a la capacité de phosphoryler une seconde protéine MEK. Dans ce modèle, deux protéines MEK sont requises : une qui fonctionne comme une « activatrice » de KSR et stimule sa dimérisation avec BRAF en libérant le domaine kinase de KSR et la seconde qui fonctionne comme un « substrat » de BRAF, qui une fois phosphorylée, induit l'activation des protéines kinases ERK1/2 (Figure 20) [291]. Les mêmes observations sont faites quant à l'activation de BRAF par KSR1 ou KSR2 [292,293]. De plus, MEK1 et MEK2 agissent de la même façon pour induire la dimérisation de BRAF avec KSR.

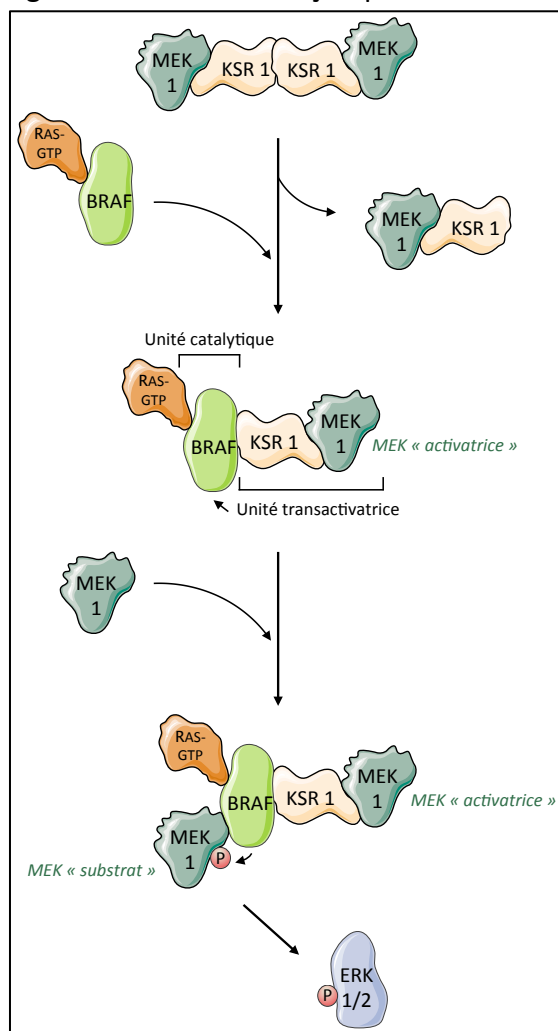


Figure 20 : Exemple du modèle d'activation de BRAF par KSR1 qui implique MEK1.

L'association d'une première protéine MEK1 « activatrice » au domaine kinase de KSR1, permet de libérer celui-ci qui était alors bloqué par la partie NTR de KSR1. L'activation de RAS permet de lever l'auto-inhibition de BRAF permettant ainsi la libération du domaine kinase de BRAF. C'est dans ces conditions que l'interaction MEK1-KSR1 confère à KSR1 la capacité de transactiver BRAF par hétérodimérisation de leurs domaines kinases. Une fois activée, BRAF a la capacité de phosphoryler une seconde protéine MEK1 « substrat ».

De plus, une étude a révélé une interaction entre la partie N-ter de BRAF et la partie N-ter de KSR qui permettrait de positionner côte à côte les domaines kinases des deux protéines pour permettre leur hétérodimérisation et donc la transactivation de BRAF par KSR [291].

D. La voie de signalisation MAPK/ERK et les virus

La voie MAPK/ERK étant impliquée dans de nombreux processus essentiels au fonctionnement d'une cellule (régulation du cycle cellulaire et traduction), il n'est donc pas si surprenant que de nombreux virus soient déjà décrits pour détourner cette voie de signalisation dans le but de pirater des fonctions cellulaires qui peuvent avoir un impact positif sur leur réplication virale.

1. Les virus oncogènes

Depuis de nombreuses années, la voie de signalisation MAPK/ERK est connue pour être ciblée par les virus oncogènes. Ces virus comprennent les rétrovirus et les virus tumoraux à ADN. Ces deux classes de virus codent des protéines qui leur confèrent la capacité de détourner cette voie de signalisation majoritairement au profit de leur réplication virale (**annexe 1**). L'activation soutenue de la voie MAPK/ERK par ces virus entraîne une prolifération accrue de la cellule infectée et provoque des transformations cellulaires qui ont pour conséquence la survenue de tumeurs à l'origine d'un certain nombre de cancers.

Les rétrovirus codent des protéines qui correspondent à des versions oncogènes des protéines cellulaires présentes dans la cascade de signalisation et qui peuvent agir à tous les niveaux de la voie [294]. L'ensemble de ces protéines est activé en absence de tout signal extracellulaire et n'est soumis à aucun contrôle cellulaire [294].

Les virus tumoraux à ADN codent quant à eux des protéines qui se lient et altèrent la fonction des protéines cellulaires impliquées dans la voie de signalisation. La dérégulation de la voie par ces virus peut se produire à tous les niveaux de la cascade de signalisation [294].

2. Les virus non oncogènes

Des données récentes ont permis de révéler que des virus non oncogènes sont également capables d'activer la voie de signalisation MAPK/ERK. Ces virus induisent l'activation de la voie dans le but de s'approprier principalement les facteurs de traduction au profil de leur propre réplication virale. De plus, l'activation de la voie MAPK/ERK peut être impliquée dans le blocage de la voie des IFN-I [295]. De cette façon, les virus peuvent avoir élaboré une nouvelle stratégie pour contrecarrer la réponse immunitaire innée. Parmi eux, on compte des virus à ADN mais également un grand nombre de virus à ARN. Certains arbovirus tels que le virus du Nil occidental (WNV pour *West Nile Virus*) [296], le virus de la fièvre jaune (YFV pour *Yellow Fever Virus*) [297] et le virus de l'encéphalite japonaise (JEV pour *Japanese encephalitis virus*) [298] sont également décrits pour activer cette voie. L'ensemble de ces virus détournent la voie de signalisation MAPK/ERK à différents niveaux dans la cascade de signalisation ayant majoritairement pour objectif de détourner la voie dans le but d'augmenter/favoriser leur réplication virale (**annexe 1**).

E. Les inhibiteurs de la voie MAPK/ERK

Comme la voie MAPK/ERK est impliquée dans environ un tiers des cancers, un arsenal thérapeutique ciblant tous les niveaux de la cascade de signalisation a été élaboré afin de contrôler certains cancers (**Figure 21**). Ces mêmes inhibiteurs pourraient d'ailleurs être utilisés pour étudier les virus non oncogènes qui détournent cette voie. Cependant, la régulation efficace de la voie MAPK/ERK est difficile au vu des différents modes et niveaux d'activation mais également du fait qu'elle soit impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires importants pour le fonctionnement biologique d'une cellule.

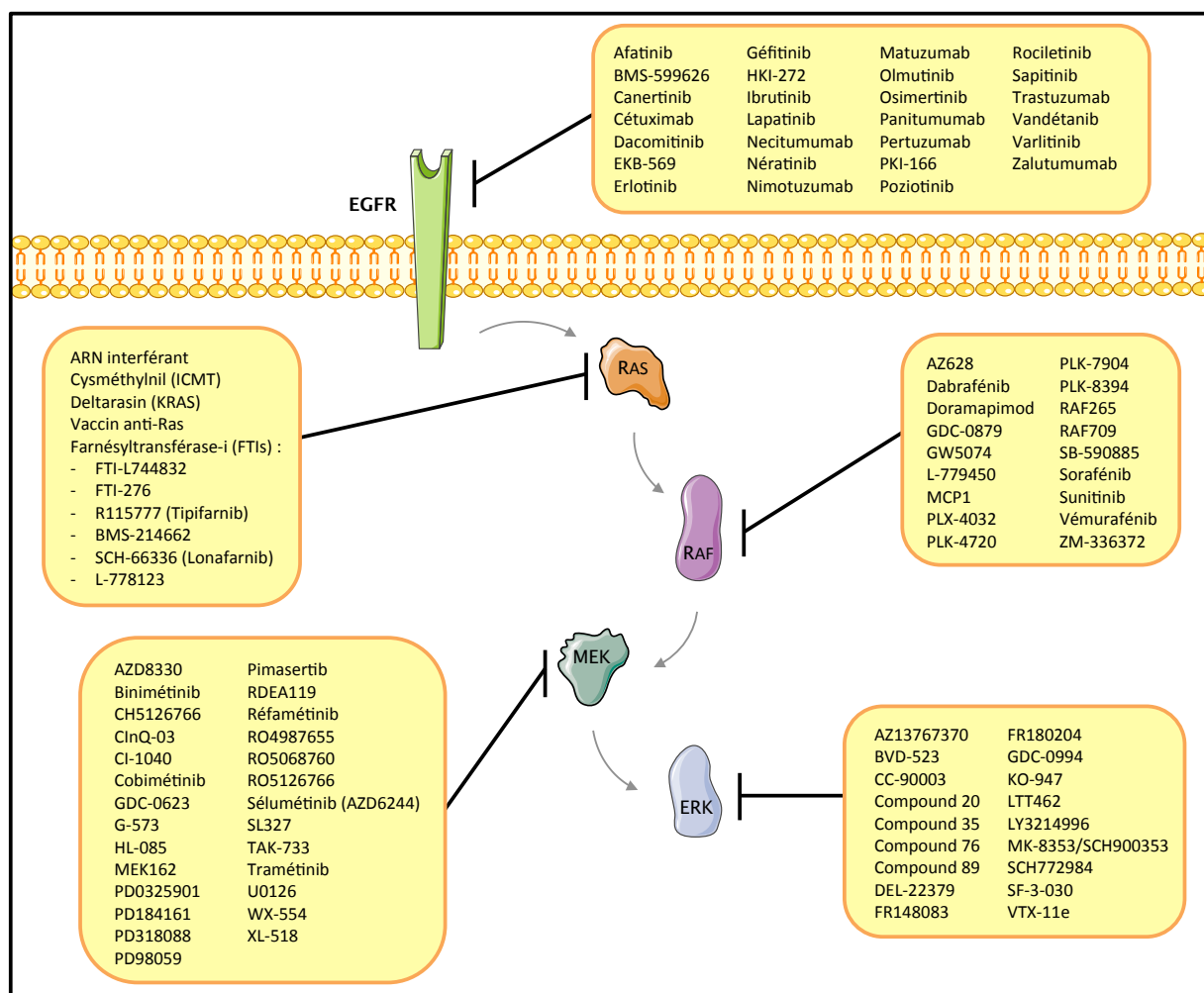


Figure 21 : Les principaux inhibiteurs de la voie MAPK/ERK.

Des inhibiteurs ciblant l'EGFR, les protéines RAS, RAF, MEK1/2 et ERK1/2 ont été élaborés afin de bloquer toute surexpression de la voie qui peut être impliquée dans un grand nombre de cas dans des cancers. La figure a été réalisée à partir de données issues des publications suivantes : [299-306]. *Liste non exhaustive d'inhibiteurs.*



OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Afin d'identifier des facteurs de virulence et de pathogénicité des différents sérotypes de BTV et de déterminer des facteurs de franchissement de la barrière d'espèce (hôtes mammifère et vecteur), mon projet de thèse a consisté à étudier les mécanismes moléculaires par lesquels le BTV détourne la machinerie cellulaire au profit de sa survie et de sa réplication.

La première partie de mon travail a consisté à identifier les interacteurs cellulaires (mammifère et vecteur) de l'ensemble des protéines codées par les sérotypes 8 et 27 (variant v02) du BTV. Ces deux sérotypes ont été choisis car le premier est le seul des sérotypes à provoquer des signes cliniques chez le bovin et se transmet par les culicoïdes et le second infecte uniquement les caprins, par contact direct entre deux chèvres, chez lesquelles il est asymptomatique. La première étape a consisté à cloner l'ensemble des ORFs codés par ces deux sérotypes et ainsi créer un « ORFeome du BTV » puis de les utiliser comme appâts pour les cribler contre deux banques d'ADN complémentaires (ADNc) spécifiques de l'hôte mammifère et vecteur naturellement infectés par le BTV (bovin et culicoïde). A mon arrivée au laboratoire, j'ai participé à la mise en place d'une plateforme de criblage à haut-débit des interactions protéine-protéine basée sur le système double-hybride en levure. J'ai donc utilisé cet outil pour identifier les partenaires cellulaires des BTV-8 et -27 (variant v02). Les interactions les plus pertinentes et les plus représentées ont ensuite été validées sur le plan biochimique par co-purification d'affinité à l'aide de la technique de GST *pull-down*.

En plus de cette approche de protéomique, le second objectif de mon projet de thèse a consisté à étudier l'impact du virus de la bluetongue sur la voie de signalisation MAPK/ERK à l'aide de différents systèmes expérimentaux (essais luciférases, outils biochimiques, inhibiteurs, etc...). En effet, la modulation de cette voie cellulaire par le BTV reste controversée aujourd'hui, une étude montre que celle-ci est activée [307] tandis que deux autres ne démontrent aucun effet [308,309]. Cette voie de signalisation majeure, en contrôlant le cycle cellulaire et en régulant l'activité de certains facteurs de la traduction, pourrait directement être reliée au cycle viral du BTV, notamment au niveau de l'expression des protéines virales.

A complex network diagram with numerous nodes and edges, forming a dense, radial structure. A smaller, circular cluster of nodes is visible in the upper left quadrant. The diagram is rendered in a light gray color, serving as a background for the text.

RESULTATS

CHAPITRE 1 :
CARTOGRAPHIE DES INTERACTIONS BTV-HOTES

CHAPITRE 2 :
IMPACT DU BTV SUR LA VOIE DE SIGNALISATION
MAPK/ERK

A complex network diagram in the background, featuring numerous small nodes connected by thin lines, forming a dense, branching structure. Several larger, more circular clusters of nodes are visible, and a few long, curved lines arc across the upper portion of the image.

CHAPITRE 1 : CARTOGRAPHIE DES INTERACTIONS BTV-HOTES

I. INTRODUCTION

La recherche des partenaires cellulaires des protéines virales du BTV et la comparaison de ces interactions se sont faites à deux niveaux : au niveau de l'hôte, en comparant les interactions obtenues entre l'hôte mammifère (bovin) et l'hôte vecteur (culicoïde) et au niveau viral, en comparant deux sérotypes de BTV (-8 et -27). Pour ce faire, nous avons mis en place au laboratoire une approche de cartographie à haut-débit des interactions basée sur la technique du double-hybride en levure. La souche de BTV-8 utilisée est originaire d'un mouton infecté en Ardenne en 2006 et la souche de BTV-27 variant v02 qui, pour des simplifications de lecture sera nommé BTV-27, est originaire d'une chèvre infectée en Corse en 2014.

II. MATERIELS ET METHODES

A. Le double-hybride en levure

1. Principe

Le double-hybride en levure ou "*yeast two-hybrid system*" (Y2H) fut découvert en 1989 par Fields et Song [310]. Cette découverte fut possible à la suite d'études réalisées en 1985 sur les facteurs de transcription eucaryotes montrant que le domaine de liaison à l'ADN (DB) et le domaine activateur de la transcription (AD) étaient physiquement séparés [311]. Fields et Song démontrèrent alors qu'il était possible de réunir ces deux domaines lorsqu'ils sont fusionnés à deux protéines connues pour interagir.

La stratégie de criblage par double-hybride en levure que nous avons mis en place au laboratoire utilise le facteur de transcription Gal4 et deux lignées de levure de type sexuel opposé :

- La souche de levure Y2H Gold (Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System), qui a été transformée avec le vecteur pPC97, qui contient un ORF viral d'intérêt (l'appât) fusionné au domaine de liaison à l'ADN (DB) de Gal4, apportant le gène LEU2 qui

- permet à la souche de pousser sur un milieu synthétique dépourvu de leucine (-L),
- La souche de levure Y187 (Clontech), qui a été transformée avec le vecteur pDEST22, qui contient une banque d'ADNc (codant les proies) fusionnée au domaine d'activation (AD) de Gal4, apportant le gène *TRP1* qui permet à la souche de pousser sur un milieu synthétique dépourvu de tryptophane (-W).

La conjugaison des deux souches de levures permet de réunir les vecteurs. Le gène rapporteur de l'interaction est *HIS3* (histidine 3) et est placé sous contrôle d'un promoteur qui contient des sites de liaison pour la partie DB de Gal4. Si les deux protéines interagissent, les domaines AD et DB de Gal4 seront physiquement rassemblés et reconstitueront le facteur de transcription Gal4 permettant l'expression du gène rapporteur *HIS3*. L'expression de ce gène est indispensable à la croissance de la levure en absence d'histidine (-H) dans le milieu de culture. Ce protocole est optimisé par l'ajout de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), un composé toxique pour la levure dégradé en présence de *HIS3* qui permet de titrer l'expression basale du gène rapporteur [312]. Le principe de cette technique est présenté sur la [Figure 22](#).

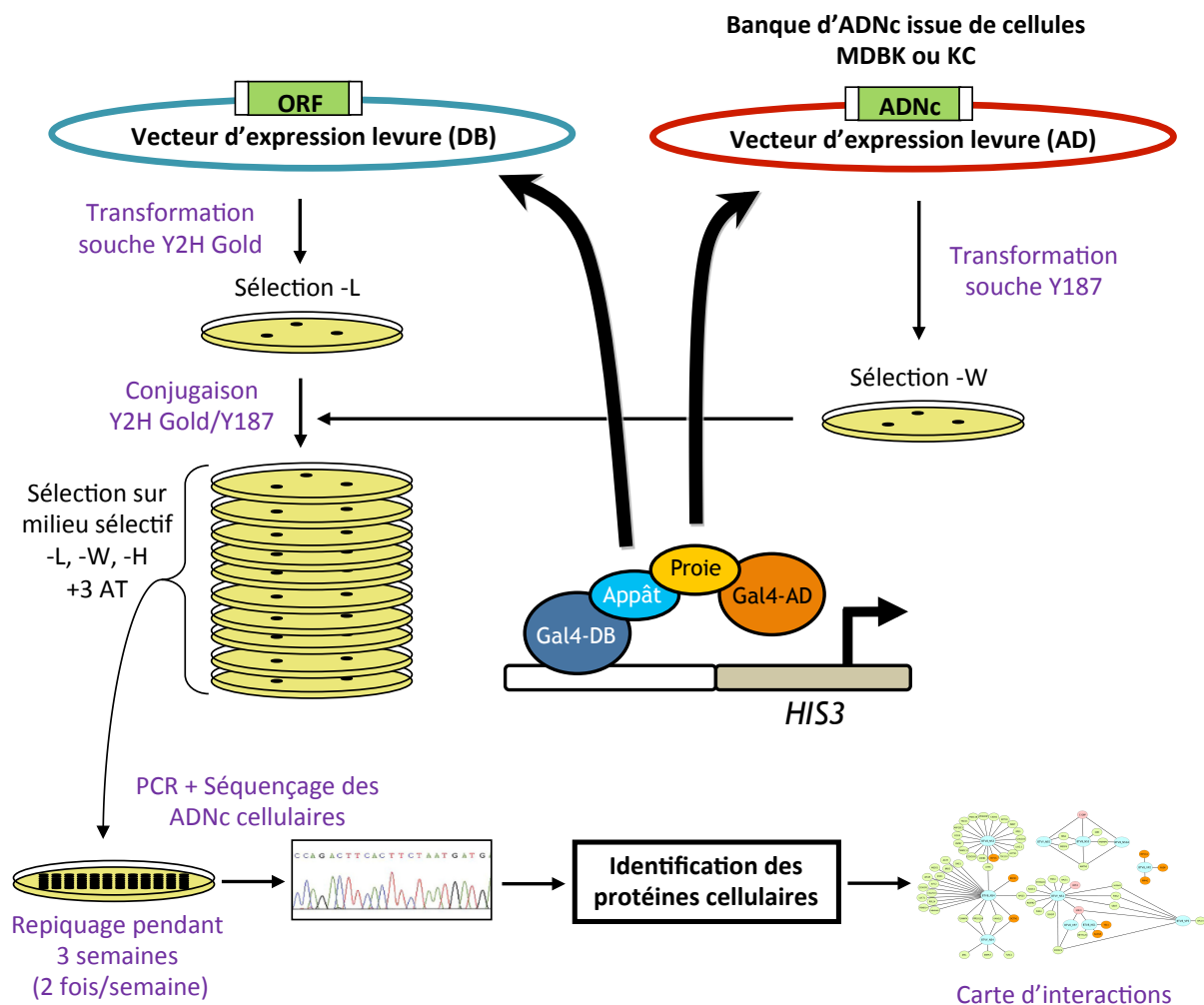


Figure 22 : Crible double-hybride en levure.

La lignée de levure Y2H Gold a été transformée avec le vecteur pPC97 contenant l'ORF viral d'intérêt fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4-DB) et correspond à notre appât. La souche de levure Y187 a quant à elle été transformée avec le vecteur pDEST22 contenant l'ADNc fusionné au domaine d'activation de Gal4 (Gal4-AD) et correspond à notre proie. L'interaction entre les protéines virales et cellulaires conduit à la reconstitution du facteur de transcription Gal4 permettant l'expression du gène rapporteur *HIS3* nécessaire à la croissance de la levure sur un milieu sélectif dépourvu en histidine (-H). L'ADNc de la proie interagissant avec l'appât a été amplifié puis séquencé. L'identification de la proie a été en partie automatisée (BLAST multiparallèle dirigé contre différentes banques ENSEMBL, GenBank, Uniprot) par l'unité de Génétique Virale et Biosécurité de l'ANSES de Ploufragan. -L : milieu synthétique complet dépourvu de leucine. -W : milieu synthétique complet dépourvu de tryptophane. -L, -W, -H + 3-AT : milieu synthétique complet dépourvu de leucine, de tryptophane, d'histidine et supplémenté en 3-amino-1,2,4-triazole (3 AT).

2. Clonage des ORFs viraux

a) Stratégie de clonage Gateway®

Afin d'obtenir une collection d'ORF, le système de clonage par recombinaison Gateway® (Invitrogen) a été utilisé. Cette technique est basée sur une recombinaison homologue *in vitro* à l'aide d'une clonase qui catalyse l'intégration d'un fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur en remplaçant un gène toxique pour *E.coli* (*Escherichia coli*). Cette technique est calquée sur la capacité des bactériophages à intégrer leur matériel génétique dans l'ADN bactérien. Pour cela, les ORFs (*Open Reading Frame* ou cadre de lecture ouvert) d'intérêt ont été amplifiés par RT-qPCR (polymérase Phusion, Finnzymes, Thermo Fisher Scientific) à partir d'ARN de cellules infectées. Les amorces utilisées pour les PCR sont spécifiques de l'ORF que l'on souhaite amplifier et possèdent aux extrémités 5' et 3' les sites de clonage attB1 et attB2 (att : *site-specific attachment*), indispensables pour la recombinaison homologue (répertoriés en **annexe 2**). Il s'en suit alors une première réaction de recombinaison homologue utilisant la BP clonase (Invitrogen) qui a lieu entre les produits de PCR (contenant les sites attB1 et attB2) et le vecteur « entrée » pDONR207 (Invitrogen) (contenant les sites attP1 et attP2) (**Figure 23**). Puis, une deuxième réaction de recombinaison entre les sites attL et attR, utilisant la LR clonase (Invitrogen) a permis de transférer les ORFs viraux du vecteur « entrée » vers différents vecteurs « destination » compatibles avec le système Gateway® : pPC97 (Invitrogen) pour être exprimés en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4-DB), pDEST27 (Invitrogen, étiquette GST pour *Gluthatione-S-Transferase*) et pCiNeo-3xFLAG (Promega, étiquette 3xFLAG).

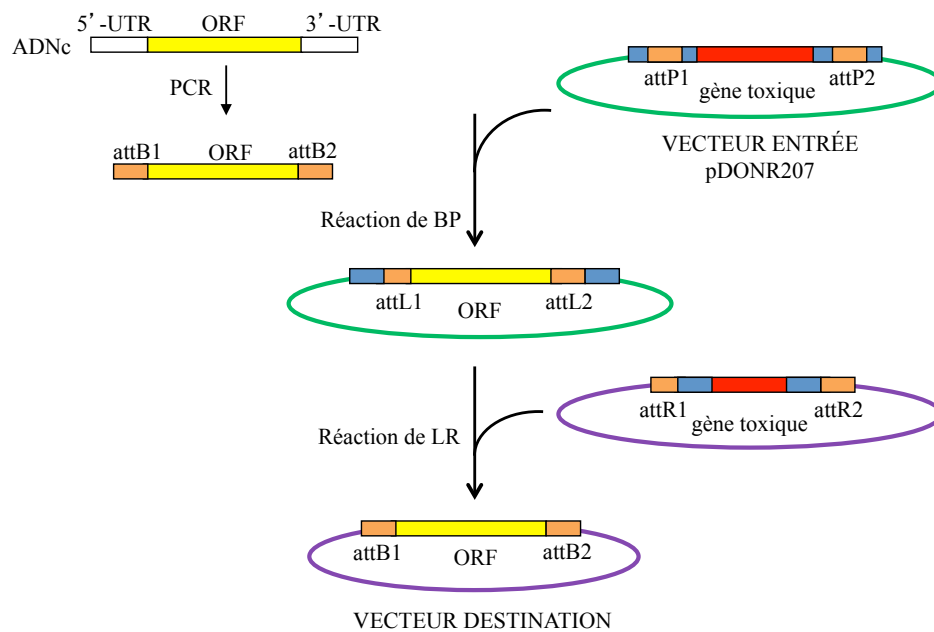


Figure 23 : Clonage par recombinaison Gateway®.

Une première réaction de recombinaison homologue de type BP vise à cloner les produits de PCR correspondant aux ORFs viraux dans un vecteur « entrée » (pDONR207). Une seconde réaction de recombinaison homologue de type LR vise à transférer les ORFs viraux du vecteur « entrée » vers n'importe quel vecteur « destination » compatible avec le système Gateway®.

b) Constructions plasmidiques

L'ensemble des ORFs (13 au total) codés par le BTV-8 et par le BTV-27 a été cloné par la technique du Gateway®. Les séquences codant pour des formes tronquées des protéines NS2 (1-130, 131-270 et 271-357) et NS3 (118-229 et 181-229) de BTV-8 et -27 ont été générées à partir des plasmides pDONR207 codant les formes entières de ces protéines en utilisant les oligonucléotides décrits dans l'**annexe 2** et du Kit HotStarTaq Master Mix (Qiagen) en appliquant les recommandations du fabricant. Les PCR ont été réalisées en utilisant 50 ng de plasmide et un cycle de dénaturation de 15 min à 95 °C puis un cycle d'amplification de 30 sec à 94 °C, 30 sec à 56 °C puis 1 min à 72 °C répétés 34 fois et une étape d'élongation de 10 min à 72 °C. Les mêmes conditions de PCR ont été utilisées pour cloner certains interacteurs bovins ou culicoïdes en utilisant comme matrice 200 ng des banques d'ADNc de cellules MDBK ou KC avec les oligonucléotides décrits dans l'**annexe 2**.

Des mutagénèses dirigées ont été réalisées afin d'obtenir les fragments NS3₁₋₁₁₇ (introduction d'un codon stop) des deux sérotypes de BTV et les fragments NS3_{Δ118-182} par insertion d'un site de restriction *EcoRI* en position 117 et 182 sur les plasmides pDONR207-NS3 (BTV-8 et -27). Cette approche a également été utilisée pour cloner le mutant NS4_{L63Q}-BTV8. L'ensemble de ces mutagénèses ont été réalisées à l'aide du kit Quick Change II Site-Directed Mutagenesis (Agilent) en utilisant un cycle de dénaturation de 30 sec à 95 °C puis un cycle d'amplification/d'élongation de 30 sec à 95 °C, 1 min à 55 °C puis 9 min à 68 °C répété 17 fois.

3. Clonage des banques d'ADNc issues de cellules MDBK et KC

Les deux banques d'ADNc (MDBK et KC) utilisées pour nos cribles double-hybride en levure ont été clonées dans le vecteur pDEST22 pour être fusionnées au domaine AD de Gal4 (proies cellulaires). Ce clonage a été pris en charge par la société Life Technologies, à partir de culot cellulaire d'une lignée MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*, cellules rénales bovines) et d'une lignée KC (cellules d'origine *Culicoides sonorensis*). L'ARN total de ces cellules a été extrait afin d'isoler les ARNm puis la bibliothèque d'ADNc a été construite en trois étapes. La première étape a consisté à faire une transcriptase inverse pour convertir l'ARNm en ADNc en utilisant la SuperScript® III transcriptase. Puis à l'aide d'une ADN polymérase, l'ADNc obtenu a servi de matrice pour générer le brin complémentaire. La dernière étape a consisté à flanquer ces ADNc avec les extrémités attB1 et attB2. Les ADNc ainsi générés ont été transformés dans le vecteur « entrée » pDONRTM222 puis dans le vecteur « destination » pDEST22 par recombinaison Gateway®.

4. Criblage des ORFs du BTV contre deux banques d'ADNc spécifiques par la technique du double-hybride en levure

La recherche de partenaires cellulaires pour l'ensemble des protéines codées par le BTV-8 et -27 a été effectuée par l'intermédiaire de deux banques d'ADNc d'origine bovine et culicoïde en utilisant la technique du double-hybride en levure.

a) Transformation des levures avec les ORFs du BTV et les banques d'ADNc

L'ensemble des protocoles en lien avec la partie double-hybride en levure a été réalisé en suivant les recommandations de *Vidalain et al., 2015* [312]. Les ORFs du BTV d'une part et les banques d'ADNc issues de cellules MDBK et KC d'autre part ont été introduits respectivement dans la souche Y2H gold et dans la souche Y187. La transformation des levures a débuté par leur mise en culture liquide à 30 °C sur la nuit dans du milieu YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*) qui utilise le glucose comme principale source de carbone. Le lendemain, les levures ont été collectées lorsque la Densité Optique à 600 nm (DO_{600nm}) était comprise entre 0,4-0,5 (transformation de la banque d'ADNc-Gal4-AD) ou 0,8-1 (transformation individuelle des ORFs viraux) puis ont été lavées deux fois dans de l'eau et une fois dans une solution de TE/LiAC (Tris-HCl EDTA 1X pH 8, acétate de lithium 100 mM). Les levures ont ensuite été resuspendues dans du TE/LiAC et ont été mélangées avec 250 ng de plasmide Gal4-DB ou 150 µg de banque d'ADNc-Gal4-AD, à respectivement 2 µL ou 500 µL d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé pendant 10 min à 100 °C et à une solution de polyéthylène glycol (PEG) (PEG 35 %, acétate de lithium 100 mM, Tris-HCl EDTA 1X pH 8). L'incubation de 45 min à 30 °C suivie d'un choc thermique à 42 °C pendant 15 min (plasmide) ou 20 min (banque), perméabilise les membranes de la levure permettant l'introduction des plasmides. La dernière étape consiste à centrifuger le mélange afin d'éliminer le PEG. Les levures transformées ont ensuite été resuspendues dans de l'eau et étalées sur milieu synthétique -L (construction plasmidique fusionnée à Gal4-DB) ou -W (banque d'ADNc-Gal4-AD).

Après transformation et croissance des levures, l'appât seul a été testé pour voir s'il n'est pas capable d'auto-activer l'expression du gène *HIS3* en absence de la proie. Ce test nous permet de déterminer la quantité de 3-AT à utiliser lors de nos cribles selon les appâts. Pour ce faire, les colonies de levures exprimant l'appât ont été resuspendues dans de l'eau puis chaque suspension a été déposée sur milieu sélectif -L-H en présence de quantité croissante de 3-AT (5 et 10 mM). Les levures ont ensuite été incubées pendant 5 jours à 30 °C.

b) Cribles double-hybride en levure

Les cribles double-hybride en levure ont débuté par la mise en culture liquide de la souche de levure Y2H Gold contenant l'appât d'intérêt dans 50 mL de milieu riche YPD (conditions optimales de croissance) toute la nuit sous agitation à 30 °C. Le lendemain, la DO_{600nm} a été mesurée et le volume de levure à additionner avec la levure Y187 contenant la proie a été calculé pour avoir une quantité d'appât égale à 1,2 fois celle de la proie, ce qui correspond à 72 unités de DO_{600nm} pour chaque appât. Avant conjugaison des deux souches de levures, la souche Y187 contenant la banque MDBK ou la banque KC a été incubée dans 10 mL de milieu YPD liquide pendant 10 min sous agitation. Après cette incubation, les deux souches de levures ont été mélangées puis centrifugées pendant 5 min à 2500 rpm. Le culot a été repris dans 1,5 mL de milieu YPD liquide puis étalé sur trois boîtes de gélose YPD et incubé pendant 4 h 30 min à 30 °C pour permettre la conjugaison des levures. Après récolte et lavage avec de l'eau milliQ, la suspension de levure a été étalée sur 12 boîtes -L-W-H additionnées de 3-AT (en général à 5 mM, dose déterminée lors du test d'auto-activation). Les milieux synthétiques (-L, -W, -H) ont été utilisés pour sélectionner les transformants et les interactions potentielles. La suspension de levure a également été ensemencée avec une dilution 1/10000^{ème} sur une boîte -L-W (en présence d'histidine) qui correspond à une boîte contrôle évaluant le nombre de diploïdes reflétant ainsi le nombre d'interactions testées lors du crible. Cette étape est importante car elle permet de déterminer si la complexité de la banque d'ADNc est recouverte, c'est-à-dire que chaque produit d'ADNc issu de la banque est testé au moins une fois pour interagir avec la protéine appât d'intérêt. Après 5 jours d'incubation à 30 °C, les clones qui ont poussés sur -L-W-H+3AT ont été repiqués sur des géloses. Ces clones ont été repiqués sur -L-W-H+3AT pendant 3 semaines, deux fois par semaine, afin d'éliminer toute contamination avec des ADNc satellitaires.

c) Identification des proies cellulaires obtenues à la suite des cribles

Afin d'identifier l'ADNc des proies cellulaires pêchées lors des cribles, la paroi des levures a été lysée par l'action d'une zymolyase (50 µL de zymolyase à 2,5 mg/mL) pendant 5 min à 37 °C suivi de 5 min à 95 °C. 4 µL de ce mélange ont ensuite été utilisés pour réaliser une réaction de PCR (Terra™ PCR direct - Takara) afin d'amplifier l'ADNc des proies cellulaires. Le programme de PCR utilisé est le suivant : 98 °C pendant 2 min puis 35 cycles correspondant à 10 sec à 98 °C, 15 sec à 62 °C et 5 min à 68 °C. Des amorces dessinées à partir du plasmide pPC86 ont été choisies pour amplifier n'importe quel ADNc codant une proie cellulaire. Avant envoi au séquençage (Eurofins), les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose (1 %).

Afin d'automatiser l'analyse des séquences pour les proies bovines, un BLAST multiparallèle dirigé contre différentes banques (ENSEMBL, GenBank, Uniprot) a été développé en collaboration avec l'unité de Génétique Virale et Biosécurité de l'ANSES de Ploufragan. Pour les interacteurs identifiés à partir de la banque KC, un BLAST automatique a également été construit à partir de données transcriptomiques issues d'une étude sur le développement de *Culicoides sonorensis* [313]. Les séquences des proies culicoïdes ont également été testées contre des banques de *Drosophila melanogaster*. Enfin, les réseaux d'interactions ont été représentés sous forme de carte à l'aide du logiciel Cytoscape [314].

B. Validations biochimiques des interactions

1. Co-purification d'affinité par la technique de GST pull-down

La technique de GST pull-down a été utilisée afin de valider les interactions obtenues par double-hybride en levure. Pour cette technique, les cellules HEK-293T (*Human Embryonic Kidney*), des cellules épithéliales humaines de rein transformées qui expriment de façon stable l'antigène T du Virus Simien 40 (SV40), ont été utilisées. Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM + GlutaMAX (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio), 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco) et 1 % de

pénicilline-streptomycine (pen-strep) (pénicilline : 50 unités/mL ; streptomycine : 50 µg/mL, Gibco) et cultivées à 37 °C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂.

Le GST *pull-down* débute par l'ensemencement des cellules HEK-293T dans des plaques de culture 6 puits à 2x10⁶ cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été co-transfectées avec 500 ng de chaque plasmide (appât + proie) pendant 48 h en utilisant le réactif jetPRIME (Polyplus transfection, Ozyme) en appliquant les recommandations du fabricant. Les plasmides codant l'ensemble des protéines virales (appâts) ont été fusionnés à la Glutathion S-Transferase (GST) et les interacteurs cellulaires (proies) ont été fusionnés à l'étiquette 3xFLAG (Figure 24). Afin d'extraire les protéines totales, 48 h post-transfection (p.t.), les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 20 mM MOPS, 120 mM KCL (pH = 7,4), 2 mM β-mercaptoéthanol et 0,5 % NP40 supplémenté en anti-protéases (Complete, Roche). 240 µL de lysats ont ensuite été incubés avec 35 µL de billes de sépharose 4B couplées au glutathion (GE Healthcare) dilués dans 500 µL de tampon de lyse pendant 2 h à 4 °C sous agitation rotative. Cette étape permet de récupérer les complexes protéiques liés aux billes grâce à l'interaction GST-glutathion. Les billes ont alors été lavées trois fois avec le tampon de lyse. Ces complexes ont ensuite été dénaturés à 95 °C pendant 5 min puis déposés sur un gel d'électrophorèse NuPAGE (4-12 % d'acrylamide, Life Technologies). La présence des protéines dans chaque échantillon a été évaluée par *Western-Blot* comme décrit ci-dessous, en utilisant des anticorps primaires GST et M2Flag couplés à la peroxydase de raifort (*Horseradish Peroxidase* ou HRP) (Sigma-Aldrich) et l'anticorps secondaire lapin (Invitrogen) spécifique de l'anti-GST couplé à la HRP (1/5000^{ème}, Invitrogen).

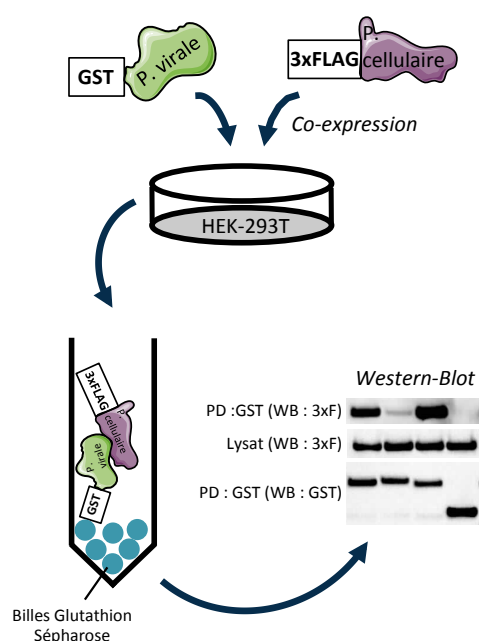


Figure 24 : Validation des interactions par co-purification d'affinité (GST pull-down).

Les protéines virales ont été fusionnées à une étiquette GST et les protéines cellulaires ont été fusionnées à une étiquette 3xFLAG. 500 ng du plasmide codant la proie cellulaire et 500 ng du plasmide codant l'appât viral d'intérêt ont été co-exprimés dans des cellules HEK-293T pendant 48 h. Des billes de Glutathion sépharose permettent la purification de la protéine virale entraînant l'éventuelle co-purification de la protéine cellulaire si celle-ci interagit avec la protéine virale. La présence de chaque protéine ainsi que l'éventuelle interaction ont été détectées par *Western-Blot* en utilisant un anticorps anti-M2Flag pour détecter la protéine cellulaire et un anticorps anti-GST pour détecter la protéine virale. PD : *Pull-Down*, WB : *Western-Blot*.

2. Préparation des échantillons protéiques (lysats totaux) et *Western-Blot*

L'expression des protéines d'intérêt a été analysée par *Western-blot*. Brièvement, les cellules ont été lysées avec un tampon contenant 120 mM NaCl, 0,5 % NP40, 1 mM EDTA et 20 mM Tris HCL à pH = 7 supplémenté en anti-protéases (Complete Roche) et anti-phosphatases (Phosstop Roche). La concentration des protéines a été déterminée par dosage à l'aide d'un kit BCA en suivant les recommandations du fabricant (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific). Les échantillons ont été dénaturés pendant 5 min à 95 °C puis ils ont été déposés sur un gel d'électrophorèse NuPAGE en quantité équivalente. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose en condition de transfert liquide à 30 Volt pendant 1 h. La membrane a été bloquée pendant 1 h à température ambiante dans du PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) contenant 5 % de lait et 0,1 % de Tween-20 ou dans du TBS (*Tris-Buffered Saline*) contenant 5 % de BSA (*Bovine Serum Albumine*) et 0,1 % de Tween-20. La membrane a ensuite été incubée toute la nuit à 4 °C en présence d'un anticorps primaire spécifique dilué dans du tampon de blocage. Après lavages au PBS-Tween20 ou TBS-Tween20, la membrane a été incubée pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la HRP dilué au 1/5000^{ème}. La détection des protéines a été réalisée par ajout de la solution Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) puis lues grâce à l'imageur Fusion Fx7 (Vilber Lourmat ; Marne-la-Vallée ; France). Les membranes ont ensuite été incubées pendant 1 h avec de l'azide afin d'éliminer la peroxydase puis une deuxième série d'anticorps primaire et secondaire a pu être appliquée sur la membrane.

3. Anticorps

Les anticorps utilisés dans l'ensemble du manuscrit de thèse ainsi que leur application sont listés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés pour les *Western-Blot*.

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution	Blocage
Actine	Souris	Sigma-Aldrich (clone AC-40, A3853)	1/10 000 ^{ème}	PBS-Lait
BECN1	Souris	Santa Cruz Biotechnology (G-11, sc-48381)	1/1 000 ^{ème}	PBS-Lait
BRAF	Lapin	Cell Signaling (D9T6S, 14814)	1/1 000 ^{ème}	TBS-BSA
eIF4E	Lapin	Cell Signaling (9742)	1/1 000 ^{ème}	TBS-BSA
GST	Lapin	Sigma-Aldrich (G7781)	1/5 000 ^{ème}	PBS-Lait
LC3A/B	Lapin	Cell Signaling (D3U4C, 12741)	1/10 000 ^{ème}	TBS-BSA
LC3B	Lapin	Cell Signaling (2775)	1/10 000 ^{ème}	TBS-BSA
NS3	Lapin	Don de Dr. Frédérick Arnaud (Lyon)	1/5 000 ^{ème}	PBS-Lait
Phospho-eIF4E (Ser209)	Lapin	Cell Signaling (9741)	1/1 000 ^{ème}	TBS-BSA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Souris	Cell Signaling (E10, 9106)	1/2 000 ^{ème}	TBS-BSA
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Lapin	Cell Signaling (9102)	1/2 500 ^{ème}	TBS-BSA
p62	Lapin	Sigma-Aldrich (P0067)	1/10 000 ^{ème}	PBS-Lait
3xFLAG	Couplé HRP	Sigma-Aldrich (clone M2, A8592)	1/10 000 ^{ème}	PBS-Lait

C. Validation fonctionnelle : exemple de l'autophagie

1. Infections virales

La principale souche virale utilisée lors des expériences est une souche de terrain de BTV-8 isolée dans les Ardennes françaises en 2006. Celle-ci provient de la collection du laboratoire national de référence (Laboratoire de santé animale, ANSES, Maisons-Alfort). L'isolement de ce virus a été réalisé sur œufs embryonnés à partir de sang d'un mouton infecté. Le stock de virus a été obtenu par infection de cellules BSR incubées à 37 °C avec 5 % de CO₂ jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathique (3-4 jours p.i.). Le surnageant ainsi que le tapis cellulaire ont été collectés. La TCID₅₀ a été évaluée sur BSR par titrage. Le virus inactivé a été obtenu après traitement aux ultraviolets (UVs) pendant 20 min. La souche virale de BTV-1 WT et la souche délétée de l'ORF codant la protéine NS4 (BTV1ΔNS4), toutes deux construites par génétique inverse (comme décrit dans les publications [315,316]), nous ont été fournies par le Dr. Houssam Attoui.

Les infections par le BTV ont été réalisées dans des cellules BSR-T7 (cellules dérivées des cellules BHK (*Baby Hamster Kidneys Cells*)), des cellules rénales d'embryons de hamster qui expriment de façon stable l'ARN polymérase T7 et la pression de sélection est maintenue par ajout de généticine (1 µg/mL) dans le milieu de culture tous les cinq passages. Ces cellules ont été cultivées de la même façon que les cellules HEK-293T (cf. partie B.1 page 101). Afin de réaliser les infections virales, les cellules BSR-T7 ont été ensemencées la veille dans des

plaques de culture de 24 puits (100 000 cellules/puits). Ces infections ont été réalisées dans 200 μ L de milieu DMEM + GlutaMAX non supplémenté, pendant 2 h à différentes multiplicités d'infection (MOI) comprises entre 0,05 et 1. Des cellules non infectées ont été utilisées comme contrôle négatif. Les cellules ont été récoltées à différents temps p.i. pour réaliser des *Western-Blot*.

2. Transfections

Les transfections de plasmides et de siARN ont été réalisées en utilisant le réactif jetPRIME (Polyplus transfection, Ozyme) en appliquant les recommandations du fabricant.

Les séquences du siARN utilisées pour cibler la bécline sont les suivantes : 5'-GAUGGUGUCUCUCGAAGAUTT-3' (sens) et 5'-AUCUUCGAGAGACACCAUCTT-3' (antisens) obtenues de la publication de Lv, S. & al, *Viruses*, 2015 [317]. Pour le traitement des cellules en culture, le siARN a été dilué à 50 pmol dans le milieu de culture.

III. RESULTATS

A. Recherche de nouveaux partenaires pour les ORFs du BTV-8 et -27 par la technique du double-hybride en levure

1. Transformation des levures Y187 avec les banques d'ADNc (MDBK et KC)

Afin d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires (bovins et culicoïdes) pour l'ensemble des protéines codées par les deux sérotypes de BTV, la première étape a consisté à introduire les banques contenues dans le vecteur pDEST22 dans la souche de levure Y187. Brièvement, la souche de levure Y187 a été transformée avec le plasmide pDEST22 contenant les banques d'ADNc de cellules MDBK ou KC, puis les levures ont été sélectionnées sur 127 boîtes de milieu synthétique -W. Après 3 jours, le nombre de transformants a été estimé. Il a été évalué à 2 179 320 clones pour la banque KC (culicoïde) et à 4 360 000 clones pour la banque MDBK (bovine) (Figure 25A).

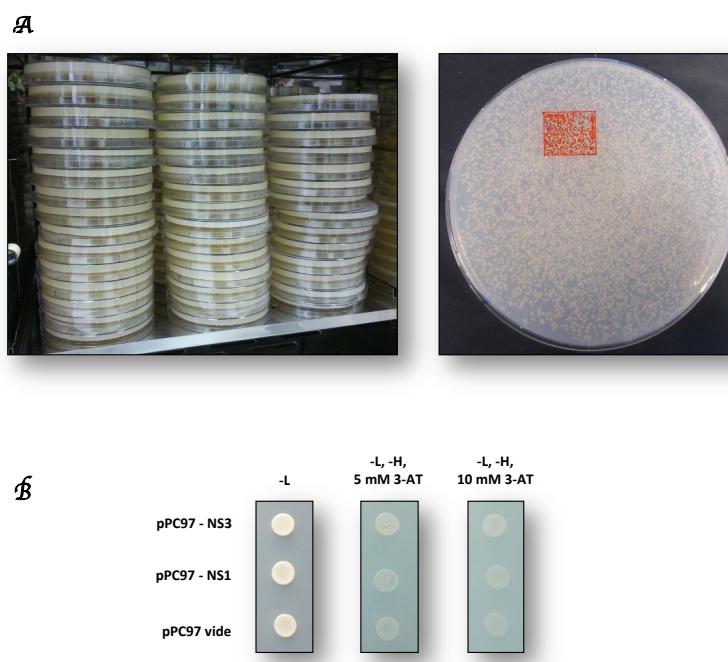


Figure 25 : Transformation des levures avec des banques codant les proies et des appâts viraux.

(A) Le plasmide pDEST22 contenant la banque d'ADNc (ici la banque KC) a été introduit (150 µg) dans la souche Y187 et l'ensemble a été étalé sur 127 boîtes de milieu synthétique dépourvu de tryptophane (panel gauche). Après 3 jours, le nombre total de colonies a été estimé à partir d'une énumération réalisée sur 5 cm² (panel droit, carré rouge). (B) Dans un premier temps, la souche Y2H Gold a été transformée avec les plasmides pPC97 contenant les ORFs viraux (ici NS1 et NS3, 250 ng) puis sélectionnés sur milieu synthétique dépourvu de leucine (-L) (panel gauche). A partir des levures sélectionnées sur -L, elles ont été resuspendues dans de l'eau puis déposées sur milieux dépourvus de leucine et d'histidine (-L -H) en présence de 5 mM (panel du milieu) ou de 10 mM de 3-AT (panel droit) afin d'évaluer leur auto-activation potentielle vis-à-vis du gène rapporteur *HIS3*.

2. Transformation des levures Y2H Gold avec les appâts viraux et test d'auto-activation

L'ensemble des ORFs viraux du BTV-8 et -27 présent dans le vecteur pPC97 ont été introduits dans la souche de levure Y2H Gold et sélectionnés sur milieu synthétique -L. Après 3 jours d'incubation à 30 °C, chaque appât a été testé pour son éventuel capacité à induire à lui seul la synthèse du gène rapporteur *HIS3* (test d'auto-activation). Pour ce faire, les colonies de levures exprimant l'appât ont été cultivées pendant 5 jours à 30 °C sur milieu sélectif -L-H en présence de quantité croissante de 3-AT (5 et 10 mM). Aucune croissance de levure n'a été observée en présence de 5 mM de drogue 3-AT, à l'exception des levures transformées avec VP7, suggérant ainsi que la concentration 5 mM de 3-AT était suffisante pour titrer efficacement l'activité transcriptionnelle résiduelle de nos protéines virales. Ainsi, tous les

cribles Y2H ont été réalisés en utilisant des boîtes -L-H + 5 mM 3-AT à l'exception de VP7 où une concentration de 10 mM de 3-AT a été utilisée (Figure 25B).

3. Résultats des cribles double-hybride pour le BTV-8 et -27 et ses hôtes

Au total, 70 cribles double-hybride en levure ont été réalisés avec un nombre de diploïdes (pour rappel, correspondant aux nombres d'interactions testées) estimé entre 8 et 66 millions en fonction des ORFs testés. En tenant compte de la complexité de nos banques estimée à environ 2 millions d'ADNc différents, nous pouvons ainsi conclure que nos cribles ont recouvert entre 4 et 33 fois la complexité de nos banques. Ainsi, chaque proie cellulaire a été testée au minimum 4 fois pour interagir avec notre appât viral.

Après 5 jours d'incubation à 30 °C, 1104 et 906 clones ont été repiqués pour le BTV-8 et le BTV-27 respectivement, sur des boîtes -L-W-H + 5 ou 10 mM de 3-AT en fonction de l'appât viral. Pour les cribles utilisant la banque MDBK, 825 clones impliquant 11 protéines virales (VP2, VP3, VP6, VP7, NS1, NS2, NS3, NS3A, NS4, NS5, NS5A) ont été repiqués pour le BTV-8 et 590 clones impliquant 6 protéines virales (VP6, VP7, NS1, NS3, NS4, NS5) ont été repiqués pour le BTV-27. Concernant la banque KC, 279 clones impliquant 7 protéines virales (VP2, VP4, VP7, NS1, NS3, NS4, NS5) ont été repiqués pour le BTV-8 et 316 clones impliquant 5 protéines virales (VP6, NS1, NS3, NS4, NS5) ont été repiqués pour le BTV-27. Aucun clone n'a été obtenu pour les protéines VP1 et VP5 des deux sérotypes et les protéines VP2, VP3 et VP4 de BTV-27. Comme le montre les résultats (Tableau 5), des clones ont majoritairement été obtenus pour les protéines non structurales NS1, NS2, NS3, NS4 et NS5. Initialement, les cribles ont été réalisés avec les formes entières des protéines NS2 et NS3, cependant comme les résultats n'ont pas été fructueux, nous avons décidé de cribler, en plus de leur forme entière, des fragments de celles-ci :

- Pour NS2 : les fragments 1-130, 131-270 et 271-357
- Pour NS3 : les fragments 1-117 et 181-229 ainsi qu'un fragment délété des deux domaines transmembranaires et de la partie extracellulaire (Δ 118-182)

A l'heure actuelle, pour le BTV-27, seule les fragments de NS3 ont été criblés. A la suite de ce découpage, les cribles de ces fragments nous ont permis d'obtenir 148 clones pour NS2 et

638 clones pour NS3.

Ces clones contenant les potentiels interacteurs ont été repiqués pendant 3 semaines, à raison de deux repiquages par semaine. Des PCRs ont ensuite été réalisées pour amplifier l'ADNc correspondant aux proies pêchées et les produits d'amplification ont été envoyés pour séquençage auprès d'Eurofins.

Tableau 5 : Nombre de clones repiqués pour chaque appâts par banque.

Les initiales ND (non déterminée) ont été indiquées pour les protéines virales ou fragments de protéines qui n'ont pas encore été criblés.

	MDBK		KC	
	BTV-8	BTV-27	BTV-8	BTV-27
VP1	0	0	0	0
VP2	3	0	33	0
VP3	46	0	0	0
VP4	0	0	2	0
VP5	0	0	0	0
VP6	14	5	0	6
VP7	55	43	27	0
NS1	37	214	48	57
NS2	2	0	0	0
NS2(1-130)	148	ND	0	ND
NS2(131-270)	0	ND	0	ND
NS2(271-357)	0	ND	0	ND
NS3	2	0	1	0
NS3A	4	ND	0	ND
NS3(1-117)	0	7	0	0
NS3(181-229)	10	3	17	110
NS3(Δ 118-182)	265	192	5	29
NS4	206	82	27	6
NS5	20	44	119	108
NS5(10-59)	13	0	ND	ND
Total	825	590	279	316

4. Identification des interacteurs pour le BTV-8 et -27

L'identification des interacteurs bovins et culicoïdes pour le BTV-8 et le BTV-27 a été obtenue à partir d'analyses comparatives des traces de séquences des proies vis à vis de séquences de référence spécifiques du bovin (*Bos Taurus*) et du culicoïde (*Culicoides sonorensis*). Grâce à ces analyses, nous avons pu identifier 76,43 % des partenaires cellulaires pêchés lors des cribles double-hybride. Cependant, un certain nombre d'interacteurs (< 25 % des cas) ne sont pas identifiés. Trois explications peuvent être émises

quant à cette non identification : **1)** des défauts d'amplification de l'ADN lors de la PCR sur levure, **2)** les séquences obtenues à la suite du séquençage ne sont pas suffisamment de bonne qualité pour une identification de la proie par BLAST et **3)** aucune identité ne peut être donnée à la proie à cause d'un manque d'annotation dans certaines parties du génome référent. Après identification des interacteurs, un filtre statistique est appliqué consistant à ne garder que les interactions identifiées deux fois ou plus. Ce filtre a pour objectif d'augmenter la robustesse du test et d'éliminer les faux positifs. En effet, il a été démontré que des interactions identifiées deux fois ou plus lors des cribles sont validées dans plus de 60 % des cas par des techniques de co-purifications d'affinités classiques [318].

5. Cartes d'interactions pour le BTV-8 et -27

Après identification des proies cellulaires et application du filtre statistique, des réseaux d'interactions ont été construits à l'aide du logiciel Cytoscape. Ainsi, nous avons réalisé deux cartes d'interaction, une pour les interacteurs bovins et l'autre pour les interacteurs culicoïdes.

La majorité des interacteurs identifiés, soit 67, est issue de la banque MDBK (Figure 26). L'analyse préliminaire de ces données révèle que les interacteurs semblent spécifiques à chaque sérotype comme par exemple pour les protéines NS1 et NS4 où peu d'interacteurs ont l'air d'être partagés entre le BTV-8 et le BTV-27. Les protéines virales NS1, VP3 et VP7 semblent partager deux interacteurs cellulaires (UBE2I et EXOSC9) laissant supposer une action synergique de ces trois protéines.

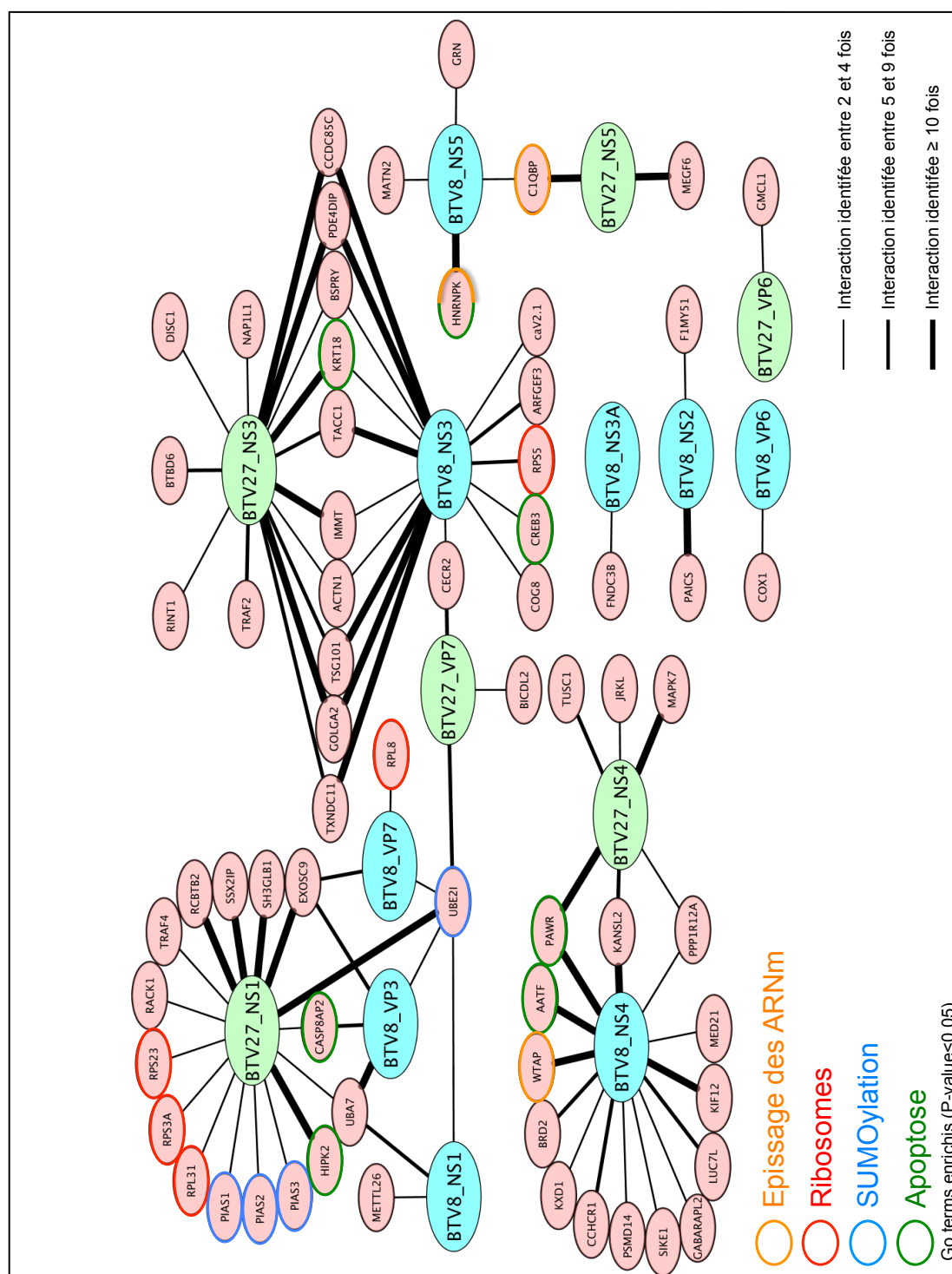


Figure 26 : Cartographie des interactions entre les protéines virales du BTV-8 et du BTV-27 et les protéines cellulaires bovines.

Cette carte d'interaction a été réalisée à l'aide du logiciel Cytoscape et représente les 67 interacteurs cellulaires bovins des protéines virales codées par le BTV-8 et le BTV-27 identifiés 2 fois ou plus. Sur cette carte, les protéines virales codées par le BTV-8 ont été représentées par un cercle bleu, les protéines virales codées par le BTV-27 ont été représentées par un cercle vert et les protéines cellulaires ont été représentées par un cercle rose. L'épaisseur des traits reliant les protéines virales et les protéines cellulaires est directement corrélée au nombre de fois où l'interaction a été identifiée. Une recherche des termes GO (Gene Ontology) à l'aide de la base de données amigo2, nous a révélé quatre modules fonctionnels statistiquement enrichis ($P < 0,05$) sur cette carte : l'épissage des ARNm (cercle orange), les ribosomes (cercle rouge), la SUMOylation (cercle bleu) et l'apoptose (cercle vert).

Un nombre plus faible d'interacteurs, soit 16, a été identifié à partir de la banque KC et ceux-ci ont été inscrits de deux façons sur la carte : avec une référence de gène *Culicoides sonorensis* (par exemple : GAWM01004552.1) et avec leur orthologue connu chez *Drosophila melanogaster* indiqué entre parenthèse (par exemple : Atg6) (Figure 27). Comme observé pour la carte bovine, une grande partie des interacteurs semblent spécifiques à chacun des sérotypes.

A l'exception de Tsg101, la majorité des interacteurs obtenus à partir de nos deux banques (MDBK et KC) est inédite. De plus, la comparaison de nos résultats révèlent que les interacteurs semblent spécifiques soit de l'hôte mammifère soit de l'hôte vecteur, à l'exception de quatre qui semblent partagés par les deux hôtes : UBE2I (= IWR), C1QBP (= p32), O18787 (= Ef1alpha100E) et HIPK2 (= hipk).

6. Les principaux processus biologiques ciblés par le BTV

Afin de préciser les voies cellulaires préférentiellement ciblés par le BTV, une analyse à l'aide du logiciel amigo2, à partir des résultats obtenus pour la banque MDBK, montre un enrichissement pour 4 processus cellulaires qui semblent être détournés majoritairement par les protéines non structurales du BTV (Figure 26) :

- l'épissage des ARNm (cercle orange) : par les protéines WTAP, C1QBP et HNRNPK qui interagissent avec les protéines NS4 et NS5,
- les ribosomes (cercle rouge) : par les protéines RPL31, RPS3A, RPS23, RPL8 et RPS5 qui interagissent avec les protéines NS1, NS3 et VP7,
- la SUMOylation (cercle bleu) : par les protéines PIAS1, PIAS2, PIAS3 et UBE2I qui interagissent avec les protéines NS1, VP3 et VP7,
- l'apoptose (cercle vert) : par les protéines HIPK2, CASP8AP2, AATF, PAWR, CREB3, KRT18 et HNRNPK qui interagissent avec les protéines NS1, NS3, NS4, NS5 et VP3.

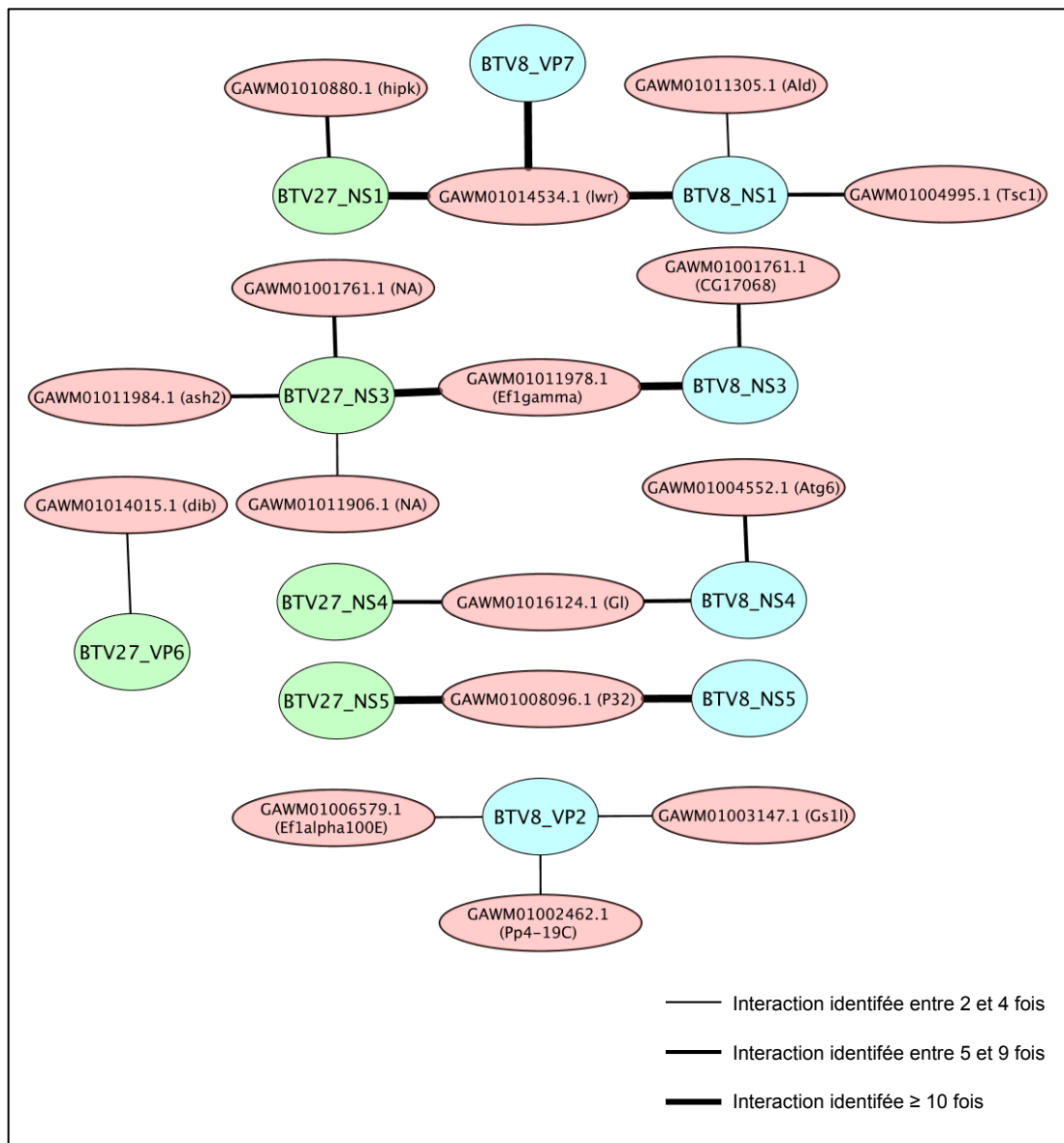


Figure 27 : Cartographie des interactions entre les protéines virales du BTV-8 et du BTV-27 et les protéines cellulaires culicoïdes.

Cette carte d'interaction a été réalisée à l'aide du logiciel Cytoscape et représente les 16 interacteurs cellulaires culicoïdes des protéines virales codées par le BTV-8 et le BTV-27 identifiés 2 fois ou plus. Sur cette carte, les protéines virales codées par le BTV-8 ont été représentées par un cercle bleu, les protéines virales codées par le BTV-27 ont été représentées par un cercle vert et les protéines cellulaires ont été représentées par un cercle rose. L'orthologue connu chez *Drosophila melanogaster* a été indiqué entre parenthèse. L'épaisseur des traits reliant les protéines virales et les protéines cellulaires est directement corrélée au nombre de fois où l'interaction a été identifiée.

B. Validations biochimiques des interactions

Sur l'ensemble des résultats obtenus, nous avons sélectionné 25 interacteurs bovins et 2 interacteurs culicoïdes afin de valider les interactions par co-purification d'affinité (*GST pull-down*). Cette sélection a été réalisée sur la base de la fonction biologique de l'interacteur mise en évidence dans la littérature, du nombre de fois où l'interacteur a été identifié et en respectant une parité d'interacteurs par appât viraux. Afin que les validations soient faites systématiquement dans les mêmes conditions, l'ensemble des protéines virales entières a été fusionné à l'étiquette GST du côté N-ter et l'ensemble des protéines cellulaires entières a été fusionné à l'étiquette 3xFLAG du côté N-ter. Pour réaliser ces validations, des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec la proie cellulaire et l'appât viral d'intérêt pendant 48 h. Les cellules ont ensuite été lysées pour extraire les protéines totales puis à l'aide de billes de Glutathion sépharose, la protéine virale d'intérêt a été purifiée entraînant la co-purification de la protéine cellulaire si celle-ci interagit avec la protéine virale. Ces protéines potentiellement complexées à leurs interacteurs ont été dénaturées puis la présence de chaque protéine a été détectée par *Western-Blot* en utilisant un anticorps anti M2Flag pour détecter la protéine cellulaire et un anticorps anti GST pour détecter la protéine virale. A l'heure actuelle, ce système nous a déjà permis de valider 9 interacteurs bovins (Tsg101, IMMT, CREB3, AATF, SIKE1, KIF12, CCHCR1, WTAP, C1QBP) et 2 interacteurs culicoïdes (GAWM01004552.1 et GAWM01008096.1 ou Atg6 et p32 respectivement chez *Drosophila melanogaster*).

- **Analyse biochimique des interacteurs de NS3**

L'utilisation de cette technique nous a permis de confirmer trois interacteurs de la protéine NS3 de BTV-8 et de BTV-27 :

- Tsg101 identifié avec la protéine NS3 de BTV-8 et -27, qui est un composant du complexe ESCRT-I qui joue un rôle important dans le trafic endosomal (cf. introduction page 58),
- IMMT identifié avec la protéine NS3 de BTV-8 et -27, qui est un composant du complexe MICOS, qui est un complexe organisateur essentiel de l'architecture

mitochondriale localisé dans la membrane interne de la mitochondrie. La fonction de IMMT est pour le moment inconnue. Étant donné que l'inhibition de la réponse immunitaire innée par la protéine NS3 de BTV a lieu en aval de MAVS [154] (cf. introduction page 61), qui est également une protéine encrée dans la membrane mitochondriale, on pourrait supposer que IMMT puisse avoir un rôle potentiel dans ce blocage du fait qu'elle possède une localisation semblable à celle de MAVS,

- CREB3 identifié avec la protéine NS3 de BTV-8, qui est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire. CREB3 avait également été identifié comme interacteur de NS3 lors de précédents cribles réalisés contre une banque d'ADNc humaine faisant ainsi de lui un candidat intéressant pour le BTV.

Les résultats présentés [Figure 28A](#) montre que IMMT interagit spécifiquement avec NS3-BTV8 et NS3-BTV27. L'interacteur Tsg101 s'est révélé interagir plus fortement avec NS3-BTV8 et plus faiblement avec NS3-BTV27 ([Figure 28B](#)), tandis que l'inverse a été observé pour CREB3 ([Figure 28C](#)). Cette différence observée pour CREB3 peut s'expliquer par le fait que NS3-BTV27 s'exprime bien mieux que NS3-BTV8. De plus, les résultats montrent que IMMT interagit également avec NS3 $_{\Delta 118-182}$ -BTV8 ([Figure 28A](#)), ce même fragment étant à l'origine de l'identification par Y2H de l'ensemble des interacteurs de NS3. En revanche, les interactions pour Tsg101 et CREB3 avec NS3 $_{\Delta 118-182}$ -BTV8 n'ont pu être pour le moment confirmées dans ce système ([Figure 28B/C](#)).

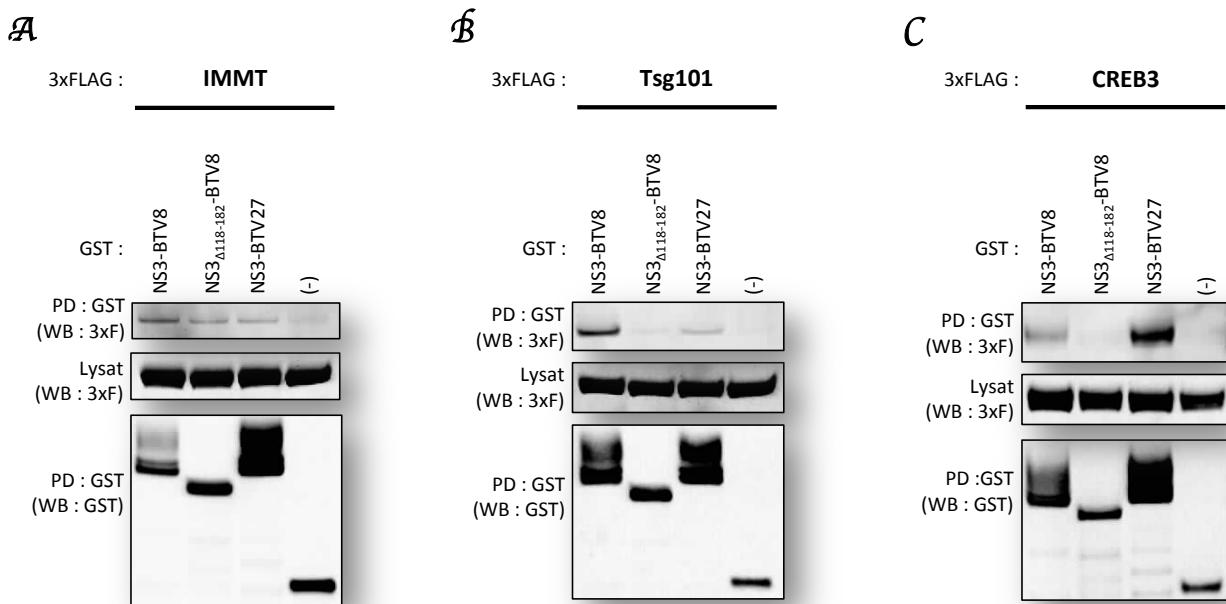


Figure 28 : Validation biochimique des interacteurs de la protéine NS3 : IMMT, Tsg101 et CREB3.

Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec des vecteurs exprimant la GST fusionnée ou non (-) aux protéines NS3-BTV8, NS3 Δ 118-182-BTV8 et NS3-BTV27 (500 ng) ainsi qu'avec un des vecteurs exprimant l'interacteur fusionné à l'étiquette 3xFLAG (500 ng). 48 h après transfection, les lysats ont été récupérés et purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. Les protéines fusionnées à l'étiquette GST ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-GST et celles fusionnées à l'étiquette 3xFLAG ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-M2Flag par *Western-Blot*. PD : *Pull-Down*, WB : *Western-Blot*.

• Analyse biochimique des interacteurs de NS4

La protéine NS4 s'est révélée être celle avec laquelle la confirmation des interactions par GST *pull-down* fonctionne le mieux. Six interacteurs, tous identifiés avec la protéine NS4 de BTV-8, ont été confirmés :

- AATF est une protéine de liaison à l'ARN polymérase II impliquée dans la régulation de plusieurs processus tels que l'apoptose, la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire,
- SIKE1 est un suppresseur physiologique de IKK ϵ et de TBK1 jouant ainsi un rôle inhibiteur dans l'activation d'IRF3 déclenchée en aval du récepteur TLR3,
- KIF12 est impliqué dans le mouvement des microtubules,
- CCHCR1 est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire mais semble également associé aux "*processing bodies*" (*P-bodies*) où elle pourrait donc jouer un rôle dans le renouvellement des ARNm cellulaires,
- WTAP est associé au complexe WMM qui intervient dans la méthylation des ARN par

la N⁶-méthyladénosine, une modification qui joue un rôle dans l'efficacité de l'épissage des ARNm,

- BECN1 est acteur majeur de l'autophagie.

L'ensemble de ces interacteurs a été testé, en plus de NS4-WT, avec un mutant de NS4-BTV8 que l'on nomme NS4_{L63Q}-BTV8 qui est décrit pour abolir la fonction de répresseur transcriptionnel de NS4 (donnée personnelle communiquée par Dr. Maxime Ratinier). Ce mutant a donc été utilisé, en parallèle de la version WT, afin d'obtenir une meilleure expression de NS4 pour favoriser sa détection par *Western-Blot*.

Les résultats présentés [Figure 29](#) montrent que KIF12, AATF, SIKE1 et CCHCR1 interagissent spécifiquement avec NS4-BTV8 et NS4-BTV27 à des niveaux quasi identiques. De plus, KIF12 se lie de manière équivalente au mutant NS4_{L63Q}-BTV8 et à la forme WT de NS4-BTV8 ([Figure 29A](#)) et AATF interagit davantage avec le mutant NS4_{L63Q}-BTV8 qu'avec NS4-BTV8-WT probablement parce que celui-ci s'exprime mieux ([Figure 29B](#)). De façon inattendue, les interactions avec SIKE1 et CCHCR1 sont drastiquement diminuées voir quasiment absentes dans le cas du mutant NS4_{L63Q}-BTV8 laissant supposer que la région de la mutation semble importante pour la liaison à ces deux partenaires cellulaires ([Figure 29C/D](#)).

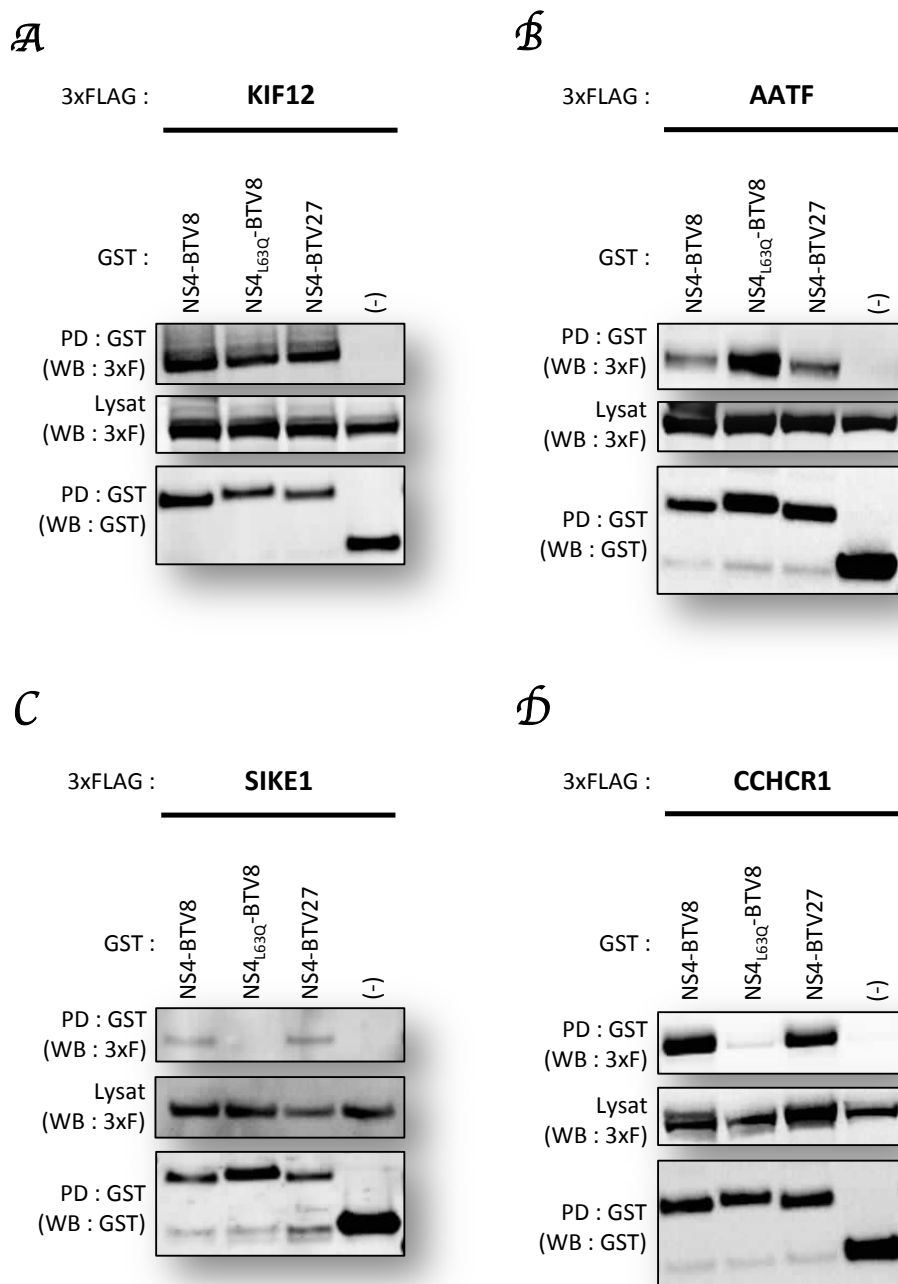


Figure 29 : Validation biochimique des interacteurs de la protéine NS4 : KIF12, AATF, SIKE1 et CCHCR1.

Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec des vecteurs exprimant la GST fusionnée ou non (-) aux protéines NS4-BTV8, NS4_{L63Q}-BTV8 et NS4-BTV27 (500 ng) ainsi qu'avec un des vecteurs exprimant l'interacteurs fusionnés à l'étiquette 3xFLAG (500 ng). 48 h après transfection, les lysats ont été récupérés et purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. Les protéines fusionnées à l'étiquette GST ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-GST et celles fusionnées à l'étiquette 3xFLAG ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-M2Flag par *Western-Blot*. PD : *Pull-Down*, WB : *Western-Blot*.

De façon intéressante, l'interacteur WTAP s'est révélé interagir plus fortement avec NS4-BTV8 et au mutant NS4_{L63Q}-BTV8 par rapport à NS4-BTV27 (Figure 30A). De plus lors des cribles, nous avons identifié deux fragments de WTAP (45-396 et 263-396) interagissant avec NS4. Aucune interaction n'est détectée avec le fragment 263-396 de WTAP, malgré l'expression des trois partenaires (Figure 30C). L'utilisation du fragment 45-396 de WTAP nous a permis de confirmer la différence observée entre le BTV-8 et le BTV-27 pour la capacité de leur protéine NS4 à interagir avec WTAP (Figure 30B). Ce dernier résultat démontre également que les 44 premiers acides aminés au sein de WTAP ne sont pas essentiels pour la liaison avec NS4.

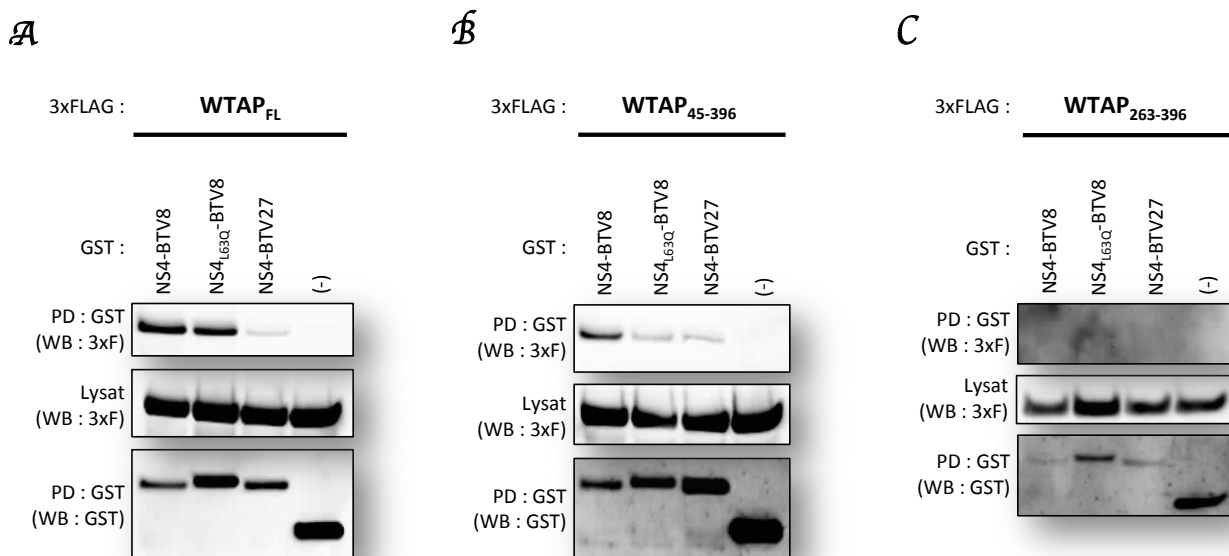


Figure 30 : Validation biochimique de l'interacteur WTAP de la protéine NS4.

Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec des vecteurs exprimant la GST fusionnée ou non (-) aux protéines NS4-BTV8, NS4_{L63Q}-BTV8 et NS4-BTV27 (500 ng) ainsi qu'avec un des vecteurs exprimant l'interacteur WTAP ou ses deux fragments fusionnés à l'étiquette 3xFLAG (500 ng). 48 h après transfection, les lysats ont été récupérés et purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. Les protéines fusionnées à l'étiquette GST ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-GST et celles fusionnées à l'étiquette 3xFLAG ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-M2Flag par Western-Blot. PD : Pull-Down, WB : Western-Blot.

L'interacteur culicoïde GAWM01004552.1 dont l'orthologue chez *Drosophila melanogaster* est Atg6, protéine équivalente à la bécline (BECN1) chez *Homo sapiens*, a également fait l'objet d'une validation par GST pull-down. Cet interacteur sera donc nommé BECN1 par convenance. Étant donné que cet interacteur a été identifié à partir de la banque KC, nous avons souhaité confirmer cette interaction à la fois avec la forme culicoïde mais aussi avec la forme bovine de la protéine. Les formes bovine et culicoïde de BECN1 se sont révélées

interagir avec la protéine NS4 de BTV-8 et de BTV-27 (Figure 31A/B). Cependant, vu le faible niveau d'expression de l'interaction BECN1-NS4 avec les deux sérotypes, le mutant NS4_{L63Q}-BTV8 a été testé et a permis de détecter une interaction légèrement plus forte. Cette interaction est donc conservée entre les deux sérotypes et les deux hôtes.

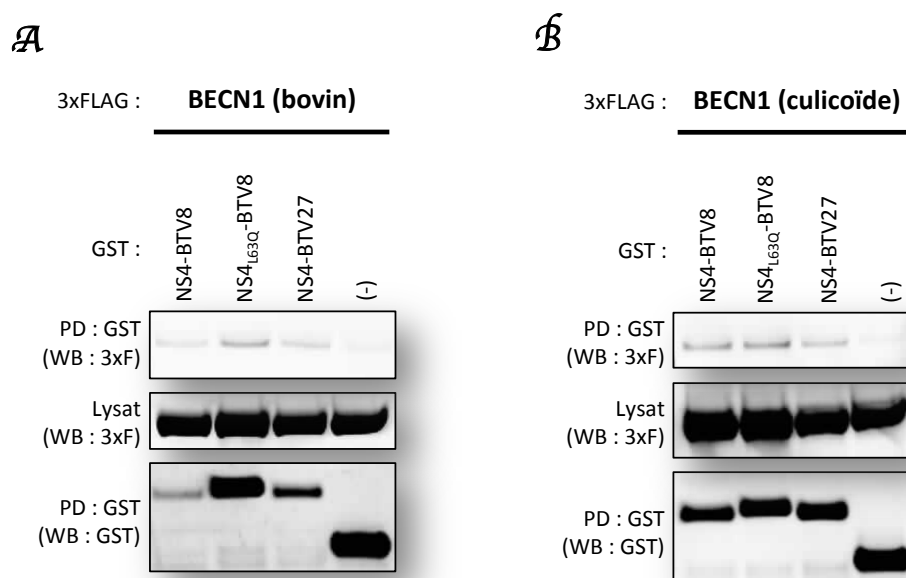


Figure 31 : Validation biochimique de l'interacteur BECN1 de la protéine NS4.

Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec des vecteurs exprimant la GST fusionnée ou non (-) aux protéines NS4-BTV8, NS4_{L63Q}-BTV8 et NS4-BTV27 (500 ng) ainsi qu'avec un des vecteurs exprimant BECN1 bovin ou BECN1 culicoïde fusionnés à l'étiquette 3xFLAG (500 ng). 48 h après transfection, les lysats ont été récupérés et purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. Les protéines fusionnées à l'étiquette GST ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-GST et celles fusionnées à l'étiquette 3xFLAG ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-M2Flag par Western-Blot. PD : Pull-Down, WB : Western-Blot.

- **Analyse biochimique d'un interacteur de NS4 et NS5**

Comme pour BECN1, du fait que C1QBP a été identifié à partir de la banque KC, nous avons décidé de valider cet interacteur versions bovin et culicoïde. De plus, C1QBP a été identifié comme interacteur de NS5 dans nos cribles mais avait aussi été identifié comme interacteur de NS4 dans des cribles réalisés avant mon arrivée au laboratoire à partir d'une banque d'ADNc humaine. C'est pourquoi, l'interacteur C1QBP a été testé avec les protéines NS4 et NS5 des deux sérotypes. C1QBP est une protéine multifonctionnelle impliquée dans l'épissage des ARNm, l'autophagie, la régulation de l'apoptose et les processus d'inflammation. Les résultats présentés Figure 32A/B montrent que les deux formes de C1QBP

interagissent avec les protéines NS4 et NS5 de BTV-8 et de BTV-27 à des niveaux quasi similaires. Nous avons également observé qu'il y a interaction entre NS5A-BTV8 et C1QBP bovine. L'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure que l'interaction est conservée d'une part entre les sérotypes 8 et 27 et d'autre part entre les formes culicoïde et bovine de C1QBP.

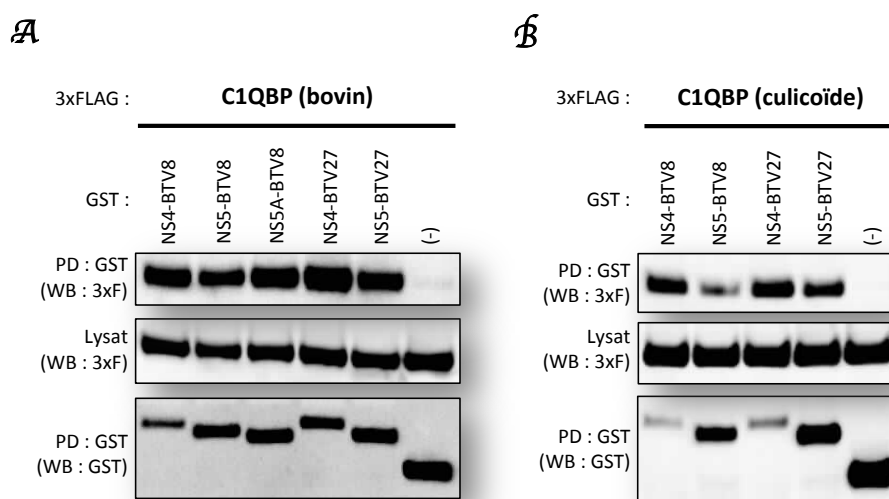


Figure 32 : Validation biochimique de l'interacteur C1QBP des protéines NS4 et NS5.

Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec des vecteurs exprimant la GST fusionnée ou non (-) aux protéines NS4-BTV8, NS5-BTV8, NS5A-BTV8, NS4-BTV27 et NS5-BTV27 (500 ng) ainsi qu'avec un des vecteurs exprimant C1QBP bovin ou C1QBP culicoïde fusionnés à l'étiquette 3xFLAG (500 ng). 48 h après transfection, les lysats ont été récupérés et purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. Les protéines fusionnées à l'étiquette GST ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-GST et celles fusionnées à l'étiquette 3xFLAG ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-M2FLAG par *Western-Blot*. PD : *Pull-Down*, WB : *Western-Blot*.

C. Validation fonctionnelle d'un interacteur : exemple de l'autophagie

Les résultats des cribles double-hybride en levure, nous ont révélé trois interacteurs impliqués dans l'autophagie : GABARAPL2 et BECN1 qui interagissent avec NS4 et C1QBP (ou p32) qui interagit avec NS4 et NS5. Comme le BTV a déjà été décrit dans la littérature pour induire l'autophagie [317] et que nous avons validé deux interacteurs (BECN1 et C1QBP) impliqués dans l'autophagie, nous avons débuté une étude fonctionnelle sur le rôle potentiel de la protéine NS4 et de son interacteur BECN1 dans l'activation de cette cascade de signalisation.

1. L'autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation très conservé de la levure à l'homme, par lequel les cellules recyclent leurs constituants et permet de maintenir l'homéostasie cellulaire. Lorsque ce mécanisme est activé il contribue à la survie et à la prolifération cellulaire. La principale forme d'autophagie dans les cellules de mammifère est la macroautophagie. Celle-ci consiste en la séquestration de la cargaison autophagique ciblée spécifiquement par p62 (ou séquestosome-1) dans une vésicule à double-membrane présente dans le cytosol appelé autophagosome. La formation de l'autophagosome implique environ 30 molécules appelées ATG (*Autophagy-related Gene*) et des complexes protéiques [319] dont BECN1 qui joue le rôle de plateforme d'assemblage et les protéines LC3A/B/C (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) et GABARAPL1/L2 (*γ-Aminobutyric Acid Receptor-Associated Protein*) qui sont nécessaire à l'élongation de la membrane de l'autophagosome [320]. Une fois formé, l'autophagosome va fusionner avec le lysosome formant ainsi l'autolysosome et le matériel cytosolique va être dégradé par les hydrolases lysosomales [319].

2. Impact du BTV sur la voie de l'autophagie

La régulation du processus d'autophagie peut être détectée et suivie au cours du temps à l'aide d'anticorps spécifiques anti p62 et LC3. En effet, son induction est à la fois corrélée à une dégradation de p62 et à une conversion de la forme I soluble à la forme II membranaire de LC3. Afin d'étudier l'impact du BTV sur la voie de l'autophagie, des cellules BSR ont été infectées avec du BTV-8 à MOI = 0,1 pendant 48 h, puis le niveau d'expression des marqueurs LC3 et p62 a été étudié par *Western-Blot*. Les résultats présentés [Figure 33A \(panel gauche\)](#) montrent une dégradation de p62 et la forme II de LC3 dans les cellules infectées par le BTV. Pour étudier si l'induction de l'autophagie par le BTV est dépendante de la réplication virale, des cellules BSR ont été infectées avec du BTV WT et du BTV traité aux UVs à trois MOI différentes (0,05 ; 0,1 et 0,25) pendant 48 h. Les résultats montrent que l'induction de l'autophagie par le BTV-8 WT est directement corrélée à la MOI testée et que ce phénomène est dépendant de la réplication virale car le BTV-UVs n'induit aucune

dégradation de p62 ou conversion de LC3 (Figure 33B).

Étant donné que trois interacteurs impliqués dans l'autophagie ont été identifiés avec NS4, nous avons émis l'hypothèse que la protéine NS4 pourrait être à l'origine de l'induction de l'autophagie par le BTV. Pour confirmer cette hypothèse, des cellules BSR ont été infectées avec un BTV-1 WT et un BTV-1 n'exprimant plus NS4 (BTV-1 Δ NS4) à une MOI de 1 pendant 30 h. Lorsque l'on compare les résultats obtenus avec ces deux virus, tous deux induisent la dégradation de p62 et la conversion de la forme I à la forme II de LC3 de façon similaire (Figure 33B - panel droit). De ce fait, dans nos conditions expérimentales, les résultats permettent de conclure que NS4 n'est pas la protéine capable d'induire l'autophagie par le BTV. Suite à cette observation, l'ensemble des plasmides permettant l'expression des différentes protéines structurales et non structurales du BTV-8 contenant une étiquette 3xFLAG fusionnée en 5' ont été transfectées pendant 24 h dans des cellules BSR afin d'identifier quelle(s) protéine(s) pourrai(en)t être responsable(s) de l'effet observé. Les résultats présentés Figure 33C montrent qu'aucune protéine n'induit la conversion de LC3 ou la dégradation de p62. Ces résultats laissent donc supposer la nécessité du contexte infectieux ou de l'association de plusieurs protéines pour l'induction de l'autophagie par le BTV.

Par la suite, nous avons souhaité identifier l'impact de l'interacteur BECN1 et du rôle de l'autophagie dans le cycle de réplication du BTV en ciblant spécifiquement BECN1 à l'aide d'un siARN spécifique de l'ARNm de BECN1 dans des cellules BSR. Les cellules BSR ont tout d'abord été transfectées avec les siARNs contrôle ou BECN1 et infectées 24 h p.t. avec du BTV-8 à MOI = 0,25. L'utilisation d'un anticorps spécifique de BECN1 a permis de vérifier l'inhibition de son expression et l'anticorps anti NS3 a permis de montrer qu'il y avait moins de NS3 dans les cellules traitées aux siARNs BECN1 par rapport aux cellules contrôles (Figure 33D). Ces résultats suggèrent donc que BECN1 aurait un effet proviral sur la réplication du BTV laissant supposer que l'induction de l'autophagie serait nécessaire pour une réplication optimale du virus.

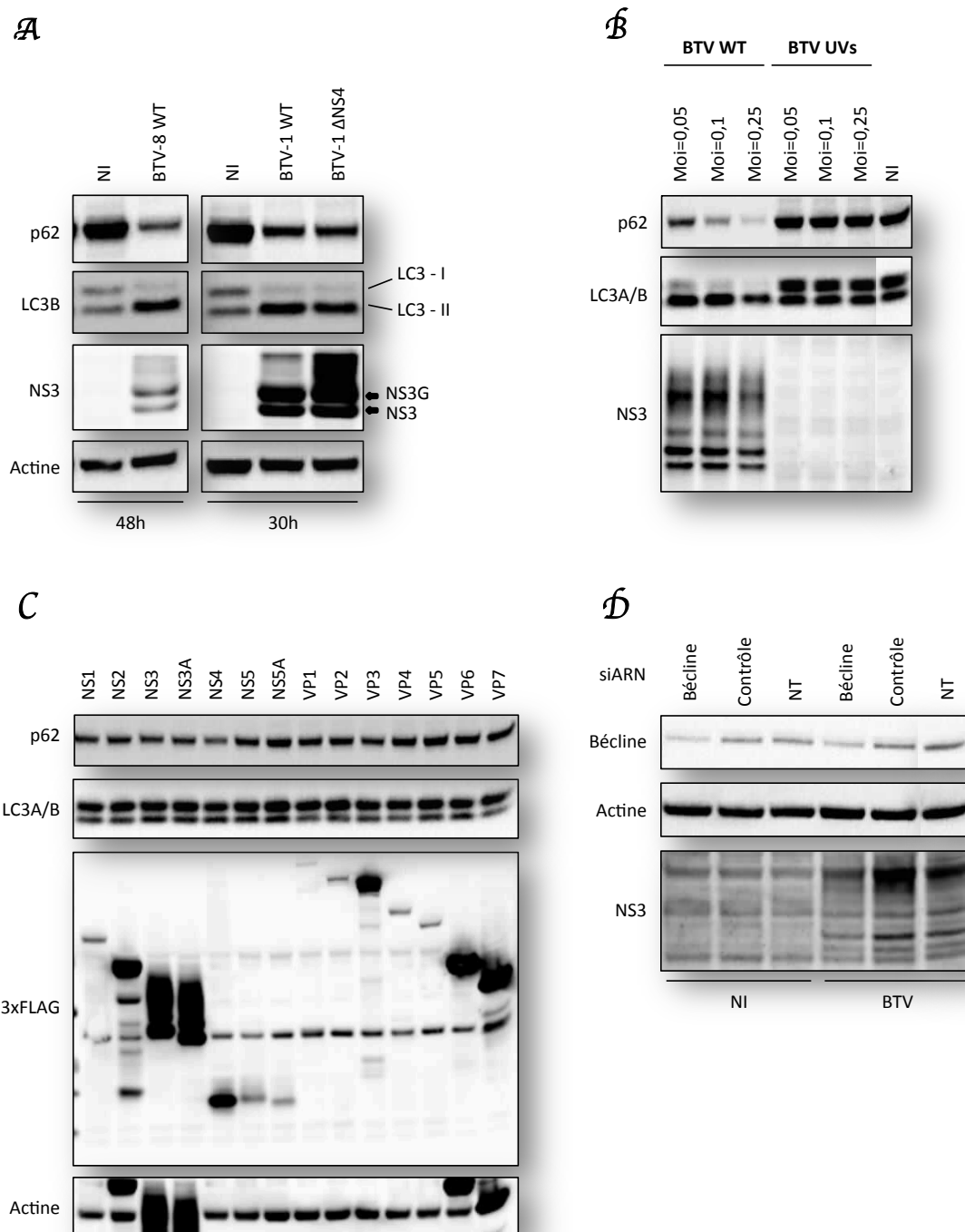


Figure 33 : Induction de la voie de l'autophagie dans des cellules infectées par le BTV.

(A) Des cellules BSR ont été infectées avec du BTV-8 (MOI = 0,1) pendant 48 h (panel droit) ou avec du BTV-1 et du BTV-1ΔNS4 (MOI = 1) pendant 30 h (panel gauche), puis l'expression des protéines p62, LC3B, NS3 et de l'actine a été déterminée à l'aide d'anticorps spécifiques par *Western-Blot*. (B) Des cellules BSR ont été infectées avec du BTV-8 WT ou du BTV-8 préalablement traités aux UVs à trois MOIs différentes pendant 48 h, puis l'expression des protéines p62, LC3A/B et NS3 a été déterminée à l'aide d'anticorps spécifiques par *Western-Blot*. (C) Les cellules BSR ont été transfectées avec l'ensemble des plasmides pCiNeo-3xFLAG codant les différents ORFs du BTV-8 (300 ng) pendant 24 h, puis l'expression des protéines p62, LC3B, NS3 et de l'actine a été déterminée à l'aide d'anticorps spécifiques par *Western-Blot*. (D) Des cellules BSR ont été transfectées avec des siARNs contrôle ou spécifique à la bécline (50 pmol) pendant 24 h, puis les cellules ont été infectées avec du BTV-8 à MOI = 0,25 pendant 24 h. L'expression de la bécline, de NS3 et de l'actine a été déterminée à l'aide d'anticorps spécifiques par *Western-Blot*.

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette première partie de ma thèse a été de cribler par la technique du double-hybride en levure l'ensemble des protéines codées par le BTV-8 et -27 contre leurs hôtes mammifère et vecteur. L'utilisation de cette technique est très avantageuse car elle permet son utilisation à grande échelle et donne des résultats de bonne qualité lorsque l'on tient compte du niveau d'auto-activation de chaque appât et de l'élimination des plasmides contaminants hébergés par la levure. Par cette technique, nous avons ainsi réalisé 70 cribles double-hybride en levure contre nos deux banques et repiqué 2010 clones. Après séquençage, 76,43 % des partenaires cellulaires ont été identifiés. L'application d'un filtre statistique, consistant à ne garder que les interacteurs identifiés deux fois ou plus, nous a permis de sélectionner 67 interacteurs bovins, 16 interacteurs culicoïdes et 4 interacteurs communs aux deux banques.

Les cribles ont identifié un grand nombre d'interacteurs pour les protéines non structurales NS1, NS3, NS4 et NS5. Du fait de leurs multiples rôles dans la régulation du cycle viral, les protéines non structurales sont probablement celles qui interagissent le plus avec les protéines cellulaires afin de cibler les fonctions cellulaires et/ou échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, certains appâts nous ont donné des résultats insatisfaisants, comme NS2 et NS3 avec lesquelles 3 proies (pour chaque appât) ont été identifiées. Des sous-domaines de ces protéines ont ainsi été clonés et nous ont permis d'identifier un nombre important d'interactions candidates (124 pour NS2 et 499 pour NS3) révélant ainsi que la conformation des protéines NS2 et NS3 dans leur état natif pouvait certainement être un frein à l'identification de partenaires par double-hybride en levure.

L'analyse des données a indiqué que la majorité des interacteurs étaient plus spécifiques de l'un ou l'autre des sérotypes plutôt que partagés. Cependant, il se pourrait que le nombre d'interacteurs communs aux deux sérotypes soit sous-estimé par rapport à la réalité. En effet, lors des validations biochimiques des interacteurs, nous avons observé que l'ensemble des interacteurs testés est finalement partagé par les deux sérotypes même s'il semble exister des différences d'affinité de liaison pour certains comme Tsg101, CREB3 et WTAP.

Pour WTAP par exemple, l'interaction plus faible avec la protéine NS4 de BTV-27 par rapport au BTV-8 pourrait provenir du fait que cet interacteur soit spécifique de l'hôte. En effet, le BTV-27 est connu à ce jour pour n'infecter que les caprins. Étant donné que nos cribles ont été réalisés avec une banque bovine, il serait pertinent de tester l'orthologue de WTAP chez le caprin contre NS4-BTV27. En outre, réaliser des cribles pour l'ensemble des protéines codées par ce sérotype contre une banque caprine serait également intéressant pour comparer les résultats à ceux obtenus avec la banque bovine. Parallèlement, nous pouvons voir que très peu d'interacteurs sont obtenus pour le BTV-27 à partir de la banque KC, cela peut s'expliquer par le fait que ce sérotype ne se transmet pas par les culicoïdes mais par contact direct entre animaux.

Les données révèlent également que nous avons identifié un plus grand nombre d'interacteurs à partir de la banque MDBK qu'à partir de la banque KC. Est-ce dû à une raison technique lié à l'approche Y2H ou est-ce le reflet d'une réalité biologique ? En effet, peut-on imaginer que le BTV ait évolué pour développer moins d'interface de liaison pour des protéines culicoïdes que bovines ? Ceci n'est d'ailleurs pas le cas pour le virus de la Dengue où un nombre plus élevé d'interacteurs a été identifié à partir de la banque de moustique *Aedes aegypti* qu'à partir de la banque humaine [321].

De plus, lorsque l'on compare les orthologues des interacteurs obtenus avec la banque MDBK et avec la banque KC, entre *Drosophila melanogaster* (pour les interacteurs culicoïdes) et *Bos Taurus*, nous identifions quatre interacteurs conservés entre les deux hôtes : UBE2I (= lwr chez la drosophile), C1QBP (= p32 chez la drosophile), O18787 (= Ef1alpha100E chez la drosophile) et HIPK2 (= hipk chez la drosophile) suggérant ainsi des fonctions communes ciblées par le BTV au sein de ses deux hôtes. De plus, lorsque l'on compare l'interactome du BTV avec ceux réalisés pour l'HCV [322] et l'EBV [323], C1QBP ressort comme interacteur commun aux trois interactomes, laissant supposer que c'est une protéine cellulaire préférentiellement ciblées par les infections virales. Cette observation illustre ainsi le fait que les virus (même issus de familles virales différentes) partagent des interacteurs et donc des mécanismes pour interférer avec la cellule hôte et son organisation. Pour aller plus loin, pour tous les interacteurs qui ne possèdent pas des fonctions connues (tel que METTL26), il serait intéressant de les utiliser comme appât pour les cribler au niveau

n+1, ce qui permettrait d'identifier les fonctions associées à l'interacteur.

Une analyse préliminaire de l'ensemble des interacteurs bovins a permis d'identifier quatre processus cellulaires enrichis : l'apoptose, la SUMOylation, la voie des ribosomes et l'épissage des ARNm.

L'apoptose est un processus cellulaire décrit pour être activé dans des cellules de mammifère suite à l'infection par le BTV et pas dans des cellules de culicoïde. Cette activation passerait par la voie de signalisation NF- κ B [324]. Même si la régulation de l'apoptose par le BTV est connue pour impliquer les protéines VP2 et VP5, nos résultats suggèrent que les protéines NS1, NS3 et NS4 pourraient également avoir un rôle. En effet, des résultats préliminaires sur la voie NF- κ B, nous ont permis d'identifier NS1 comme capable d'inhiber d'environ 50 % le promoteur NF- κ B (données non montrées). Le rôle de ces deux protéines virales, de leurs interacteurs et du lien avec la voie NF- κ B dans la régulation de l'apoptose reste donc à déterminer.

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle essentielle chez les eucaryotes visant à une liaison covalente d'une protéine SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) sur un résidu lysine de la protéine substrat. La cascade enzymatique est proche de celle de l'ubiquitination. La SUMOylation est étroitement liée à l'immunité innée [325]. Il est décrit que les agents pathogènes (virus, bactérie) détournent le processus de SUMOylation afin d'inhiber la réponse antimicrobienne et de promouvoir leur survie [326]. La SUMOylation des protéines virales affecte leur localisation intracellulaire et peut avoir des effets positifs ou négatifs sur leur fonction [325]. Des approches de double-hybride en levure ont permis d'identifier un grand nombre de virus capable d'interagir avec les protéines SUMO ou avec les enzymes E2 et les E3-SUMO ligases auxquels appartiennent les protéines de la famille PIAS [325]. Parmi ces virus, les virus Ebola, Hantaan, Séoul et de la leucémie murine sont décrits pour interagir avec les protéines PIAS1 et PIAS2 comme le BTV [325]. Les protéines PIAS sont décrites pour assister la liaison de UBE2I, qui est la seule E2-SUMO enzyme humaine connue à ce jour, pour catalyser la réaction de SUMOylation [327]. Il reste donc à déterminer si le BTV détourne le système de SUMOylation pour sa propre survie et/ou réplication ou si au contraire il régule négativement ce processus.

En plus d'interagir avec des protéines impliquées dans la SUMOylation, NS1 cible des protéines impliquées dans la structure du ribosome. Comme NS1 est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes du BTV [112] cela ne semble pas si surprenant que celle-ci interagisse avec de telles protéines afin de pirater les ribosomes pour favoriser la synthèse des protéines du BTV. Cependant, une telle fonction n'est pas décrite pour NS1. Il serait donc intéressant, dans un premier temps, de confirmer ces interactions par *GST pull-down*.

De plus, NS4 et NS5 interagissent avec des protéines impliquées dans l'épissage des ARNm laissant supposer que le BTV détourne des protéines impliquées dans ce processus au profit de sa propre réplication virale. En outre, HNRNPK, identifié avec NS5-BTV8 lors des cribles double-hybride mais non validé par *GST pull-down*, possède une localisation nucléaire appuyant ainsi l'hypothèse que NS5 se localise au nucléole du fait de cette interaction. De plus, une étude a démontré que l'extinction de HNRNPK par siARN diminue le cycle de réplication du CHIKV [328]. Il serait donc intéressant de réaliser la même expérience afin d'étudier l'impact de l'extinction de HNRNPK sur la réplication du BTV.

Une étape importante de cette partie de mon projet de thèse a consisté à confirmer l'interaction sur le plan biochimique par co-purification d'affinité (*GST pull-down*).

Dans un premier temps, les 25 interacteurs bovins et les 2 interacteurs culicoïdes, choisies sur la base de leur relevance biologique et du nombre de fois où ils ont été identifiés, ont été validés biochimiquement par *GST pull-down*. 11 interactions impliquant 9 interacteurs bovins (Tsg101, IMMT, CREB3, AATF, SIKE1, KIF12, CCHCR1, WTAP et C1QBP) et 2 interacteurs culicoïdes (BECN1 et C1QBP) ont d'ores et déjà été validées. Deux raisons peuvent être apportées pour expliquer le fait que 16 interacteurs bovins n'ont pas encore été confirmés :

- dans la majorité des cas, seuls des fragments des proies cellulaires ont été identifiés par double-hybride. Or, nous avons comme objectif de valider l'interaction entre les formes entières des protéines à la fois côté viral et cellulaire. Ces formes entières peuvent avoir, dans certains cas, des conformations tridimensionnelles pouvant gêner la confirmation de l'interaction,
- le niveau d'expression très faible de certaines protéines (virales ou cellulaires) et/ou

leur instabilité/dégradation est un frein important à la validation biochimique. Par exemple, aucun interacteur de la protéine NS1 n'a pu être validé par co-purification probablement en raison d'une quantité trop faible de NS1.


Nous sommes à présent en train de cloner les fragments des protéines cellulaires (les mêmes que ceux identifiées lors du crible double-hybride) dans le but de valider d'autres interacteurs de NS3, NS4 et NS5. En ce qui concerne NS1 et son défaut d'expression et/ou stabilité, d'autres systèmes de validation sont envisagés, comme l'étiquette « One-STREP-tag » qui permet une validation par billes de sépharose couplées à la streptavidine. On peut aussi imaginer déplacer l'étiquette GST ou 3xFLAG du côté C-ter de la protéine pour augmenter la stabilité/dégradation de l'un et/ou l'autre partenaire ou même favoriser directement l'interaction. De plus, d'autres techniques peuvent être utilisées pour confirmer des interactions protéines-protéines permettant ainsi de fournir des preuves supplémentaires pour la validation des interactions :

- la GPCA, élaboré par Yves Jacob [3], qui permet d'étudier la dynamique des interactions protéines-protéines dans des cellules de mammifère lorsque que les partenaires sont fusionnés à des fragments complémentaires d'une protéine rapportrice, la *Gaussia* luciférase. Cette approche a l'avantage d'être non seulement qualitative mais également quantitative car la luminescence est directement proportionnelle à la robustesse de l'interaction testée. Elle permet également de tester les interactions à haut-débit puisqu'elle se fait en plaque 96 puits,
- nous pouvons une nouvelle fois utiliser le double-hybride en levure mais cette fois-ci en connaissant à l'avance les deux protéines testées pour interagir. Pour cette approche, nous utiliserons la capacité des levures à faire des recombinaisons homologues en présence du produit de PCR de la proie identifiée lors des cribles et du plasmide pPC86 linéarisé (gap repair). Son avantage est que l'interacteur est directement validé avec les produits de PCR obtenus lors des cribles, sans aucune nécessité de le cloner. De plus, celui-ci peut également être testé face à différents appâts.

En parallèle des validations biochimiques, il est intéressant d'étudier la conséquence

fonctionnelle des interacteurs validés sur la réplication du BTV. Pour ce faire, des expériences visant à surexprimer ou éteindre l'expression des interacteurs peuvent être réalisées permettant ainsi de savoir si l'interacteur possède plutôt un effet pro- ou anti-viral sur la réplication du virus. Par exemple, nous avons déjà pu observer que l'extinction de BECN1 induit une diminution de l'expression de NS3 laissant supposer un effet proviral de cette protéine sur la réplication du BTV. Par ailleurs, nous avons confirmé l'induction de l'autophagie dans des cellules infectées par le BTV, phénomène déjà mis en évidence par Lv et ses collaborateurs en 2015 [317]. Suite à ces observations, nous avons voulu identifier quelle(s) protéine(s) serai(en)t responsable(s) de l'induction de l'autophagie par le BTV. L'ensemble des résultats obtenus nous laisse supposer la nécessité d'une association d'un ensemble de protéines ou du contexte infectieux pour l'induction de l'autophagie par le BTV. En effet, NS3 (interacteur OPTN [197]) et NS4 (interacteurs BECN1 et C1QBP) interagissent avec des protéines impliquées dans la voie de l'autophagie suggérant une association synergique de ces protéines dans ce phénomène. Cependant, il se pourrait que l'induction de l'autophagie par le BTV ait lieu lors d'une accumulation accrue du virus dans la cellule.

Comme les cribles nous ont permis d'identifier BECN1 à partir de la banque KC, ce résultat suggère que l'impact de l'autophagie sur la réplication du BTV pourrait être plus spécifique au culicoïde. Il a été décrit que l'insecte peut utiliser l'autophagie soit comme mécanisme de défense antivirale soit pour augmenter la transmission virale. Dans l'étude de *Chen et al., 2017* [329], il a été démontré que le Reovirus de plante RGDV (*Rice Gall Dwarf Virus*) induit l'autophagie chez son insecte vecteur (*Recilia dorsalis*) pour favoriser une transmission virale efficace. On pourrait donc supposer que le BTV a évolué pour induire l'autophagie chez son hôte vecteur pour favoriser sa transmission et donc sa propagation à l'hôte mammifère. Étant donné que le BTV se réplique bien chez la drosophile, il serait intéressant d'observer l'impact de l'infection par le BTV WT et BTV Δ NS4 chez la drosophile présentant un défaut d'expression du gène Atg6 (l'orthologue de BECN1 chez la drosophile). Cette approche permettrait d'évaluer l'importance de l'interaction NS4-BECN1 sur la régulation de l'autophagie dans les cellules d'insecte infectées par le BTV.



CHAPITRE 2 : IMPACT DU BTV SUR LA VOIE DE SIGNALISATION MAPK/ERK

I. INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, les virus oncogènes sont connus et décrits pour pirater la voie de signalisation MAPK/ERK afin de mettre en place un processus cancéreux mais également pour détourner des fonctions cellulaires au profit de leur propre réplication. Ces dernières années, plusieurs études ont révélé que des virus à ADN et à ARN non oncogènes sont également capables de détourner la voie MAPK/ERK afin de pirater les facteurs de traduction et de transcription pour leur propre intérêt, notamment pour favoriser la réplication de leur génome. A l'heure actuelle, peu d'études ont été réalisées concernant l'interaction du BTV avec cette voie de signalisation. Les résultats publiés restent notamment controversés, démontrant dans un cas l'activation de la voie par le BTV et dans d'autres, l'absence d'impact. C'est pourquoi, l'objectif de cette partie de mon projet de thèse a été de déterminer l'effet du BTV sur la voie de signalisation MAPK/ERK en étudiant les différents mécanismes moléculaires qui peuvent être mis en jeu. Ce travail fait l'objet d'un article en cours de rédaction dans lequel je suis premier auteur.

II. MATERIELS ET METHODES

A. Clonage et plasmides

La même stratégie de clonage que celle décrite dans le chapitre 1 (page 96) a été utilisée. Les différents ORFs viraux du BTV-8 ont été clonés dans le vecteur pCiNeo-3xFLAG (Promega) pour étudier leur impact sur des voies de signalisation cellulaire (MAPK/ERK et IFN-I) et dans le vecteur peGFP-C1 (Clontech) pour étudier leur localisation subcellulaire. L'ORF codant NS3 de BTV-1, BTV-27, EHDV, AHSV et EEV ont été clonés dans le vecteur pCiNeo-3xFLAG en suivant la même stratégie que dans le chapitre 1 (page 97). Les différents fragments de NS3-BTV8 ont été obtenus de la même façon que ceux générés dans le chapitre 1 (page 97) et le mutant ALL-EEE de NS3-BTV8 a été obtenu par mutagenèse dirigée comme décrit dans le chapitre 1 (page 97). L'ensemble des oligonucléotides sens et anti-sens utilisés pour les différents clonages est listé en **annexe 2**.

B. Cellules

Les cellules qui ont été utilisées dans l'ensemble de cette partie sont les suivantes :

- HEK-293T, décrites dans le chapitre 1 (page 101)
- HeLa (*Henrietta Lacks*), des cellules épithéliales humaines provenant d'une patiente Afro Américaine (Henrietta Lacks) atteinte d'un cancer du col de l'utérus.
- MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*), des cellules épithéliales bovines de rein.

Ces trois lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu DMEM + GlutaMAX supplémenté (SVF, sodium-pyruvate et pen-strep) à 37 °C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂.

C. Infections virales

Les conditions d'infection ont été décrites dans le chapitre 1 (page 104). La souche virale utilisée dans cette étude est la souche de BTV-8 décrite précédemment. Pour réaliser les infections avec le BTV, des cellules HEK-293T, HeLa ou MDBK ont étéensemencées dans des plaques de culture de 24 puits (500 000 cellules/puits pour les HEK-293T et 100 000 cellules/puits pour les HeLa et les MDBK). Après 24 h, les cellules ont été infectées avec la souche de BTV-8. Le virus a été utilisé à des MOI comprises entre 0,002 et 0,1 pour les HEK-293T (déposés goutte à goutte sur le milieu de culture) et 0,01 pour les HeLa et les MDBK (dans 200 µL de DMEM non supplémenté pendant 2 h). En fonction des expériences, les surnageants ainsi que les tapis cellulaires ont été récoltés à différents temps p.i. pour réaliser des titrages, des *Western-Blot* et des RT-qPCR.

D. Transfections

Les transfections des constructions plasmidiques et des siARNs dans les cellules HEK-293T et HeLa ont été réalisées en utilisant le réactif jetPRIME (Polyplus transfection, Ozyme) en appliquant les recommandations du fabricant. Les siARNs spécifiques de GRB2, KSR, RASGRP1, Sef et MP1 proviennent de chez Sigma-Aldrich tandis que le siARN de BRAF

provient de chez Dharmacon (SMARTpool : ON-TARGETplus Human BRAF siRNA) et contient 4 couples de siARNs différents. Les siARNs ont été utilisés à 25 nM ou 50 nM.

E. Tests rapporteurs

Pour évaluer et quantifier l'activation de la voie MAPK/ERK, les plasmides utilisés ont été les suivants : pFA2-Elk1-DB (Stratagene) qui permet l'expression du facteur de transcription Elk-1 fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4, pGal4-UAS-Luc qui contient une séquence promotrice du gène rapporteur Gal4-luciférase (fourni par le Dr. Yves Jacob ; Institut Pasteur de Paris). Pour la voie d'induction de la réponse IFN-I : pIFN- β -Luc (Stratagene) composé du gène codant pour la luciférase firefly sous le contrôle du promoteur IFN- β et le plasmide p Δ RIG-I comprenant les domaines CARD de la protéine RIG-I (activateurs constitutifs de la voie IFN- β a été fourni par le Dr. Eliane Meurs (Institut Pasteur de Paris). Afin de normaliser les résultats des tests luciférase le plasmide rapporteur pRL-CMV (Promega) codant pour le gène de la luciférase *Renilla* placé sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV) a été utilisé.

Pour les essais sur la voie MAPK/ERK, un jour après mise en plaque des cellules (plaques de culture de 24 puits ; 500 000 cellules/puits), elles ont été transfectées avec 1 μ L de jetPRIME, 10 ng de pRL-CMV, 100 ng du plasmide pGal4-UAS-Luc et 100 ng du vecteur pFA2-Elk1-DB permettant de quantifier l'activation du facteur de transcription Elk-1. Les cellules ont été co-transfectées simultanément avec les vecteurs pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombinés avec les ORFs viraux d'intérêt (300 ng), ou bien infectées 18 h p.t. du système rapporteur, avec différentes MOIs (0,002 ; 0,01 ; 0,05) de BTV-8. 18 h p.t. ou au moment de l'infection, les cellules ont été privées de sérum pendant 6 h puis stimulées avec 400 ng/mL d'EGF (Sigma-Aldrich) entraînant l'activation de Elk-1 conduisant ainsi à l'induction de l'expression du gène rapporteur codant la luciférase. 18 h après stimulation, les cellules ont été lysées puis les activités de la firefly luciférase et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées au luminomètre Alpha-LISA (PerkinElmer) par ajout des substrats correspondants (Bright-Glo et Renilla-Glo *Luciferase Assay System*, Promega). Les valeurs de *Renilla* luciférase servent à normaliser celles de la firefly luciférase et permettent d'évaluer l'efficacité de transfection ainsi que la viabilité cellulaire. Lorsque cela est indiqué, les

cellules ont été traitées avec les inhibiteurs U0126 (Promega) et GDC-0879 (Clinisciences) dont leurs modes d'action seront détaillés ultérieurement. Les données représentées correspondent à la moyenne des triplicatas d'une expérience reproduite au moins trois fois. Pour les essais sur la voie des IFN- α/β , un jour après leur mise en plaque (plaques de culture de 24 puits ; 500 000 cellules/puits), les cellules ont été transfectées avec 1 μ L de jetPRIME, 10 ng de pRL-CMV, 100 ng d'un plasmide pIFN- β -Luc, 100 ng d'un plasmide p Δ RIG-I et 300 ng des vecteurs pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombinés avec les ORFs viraux d'intérêt. Lorsque cela est indiqué, les cellules ont été traitées avec l'inhibiteur U0126 24 h p.t.. Après 24 h, les cellules ont été lysées et les activités de la firefly luciférase et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées comme décrit ci-dessus.

F. Préparation des échantillons protéiques (lysats totaux) et *Western-Blot*

Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans le chapitre 1 (page 103).

G. Co-purification d'affinité par GST *pull-down*

Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans le chapitre 1 (page 101).

H. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a été utilisée afin d'identifier des nouveaux partenaires cellulaires de la protéine NS3 de BTV-8. Pour ce faire, des cellules HEK-293T ont étéensemencées dans des plaques de culture de 6 puits ($2 \cdot 10^6$ cellules/puits). Après 24 h, les cellules ont été transfectées avec 1 μ g de vecteur pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné avec l'ORF codant NS3 de BTV-8 ou infectées avec du BTV-8 à MOI = 0,1. 24 h p.t. ou 18 h p.i. les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse contenant 135 mM NaCl, 0,5 % NP40, 1 mM EDTA et 20 mM Tris HCL à pH = 7 supplémenté en anti-protéases et anti-phosphatases. Après centrifugation pendant 10 min, une pré-adsorption des lysats sur billes

en absence d'anticorps a été réalisée pendant 45 min sur agitation rotative à 4 °C afin d'éliminer les interactions non spécifiques de protéines du lysat avec les billes. Puis l'immunoprécipitation a eu lieu avec 40 µL de billes de protéine G-sépharose (Roche) additionnés de 2,5 µg d'anticorps anti-NS3 pendant 3 h à 4 °C. Trois lavages de 5 min sur agitation rotative avec du tampon de lyse ont ensuite été effectués avant de dénaturer les complexes protéiques à 95 °C pendant 10 min et de les analyser par électrophorèse en gel NuPAGE. L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée en prestation de service par la plateforme de protéomique/spectrométrie de masse de l'Institut Jacques-Monod. Brièvement, les échantillons protéiques ont été digérés à la trypsine à partir du gel NuPAGE, puis les produits peptidiques ont été extraits séquentiellement du gel avec 30 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique et 70 % d'acétonitrile. Les peptides ont été analysés par Q-Exactive Plus couplé à un Nano-LC Proxeon 1000 (Thermo Scientific) avant d'être séparés par chromatographie et analysés par Orbitrap. Pour l'étape d'identification des peptides, toutes les données MS et MS/MS ont été analysées avec le logiciel Proteome Discoverer (Thermo Scientific, version 2.2) et le moteur de recherche Mascot (Matrix Science, version 5.1) utilisant la base taxonomique d'*Homo sapiens* à partir de SwissProt (02/17). Les identifications de peptides ont été validées à partir d'un seuil FDR fixé à 1 % calculé avec l'algorithme Percolator. Seules les protéines identifiées à partir de deux peptides ou plus ont été considérées. Les protéines identifiées ont été considérées comme partenaires potentielles de NS3 uniquement lorsque ces identifications ont été absentes du contrôle.

I. Microscopie à fluorescence

Deux approches ont été utilisées pour étudier la localisation subcellulaire des protéines : de la fluorescence directe avec les protéines fusionnées à la GFP et de l'immunomarquage.

Pour la fluorescence directe, les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques de culture de 24 puits (Ibidi, BioValley) (100 000 cellules/puits). Un jour après, les cellules ont été transfectées avec les plasmides codant la protéine virale d'intérêt fusionnée à l'étiquette GFP pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été fixées avec 250 µL de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % (Electron microscopy sciences) pendant 30 min à température ambiante, lavées au PBS,

puis incubées dans 500 μ L de PBS contenant de la glycine (PBS-glycine) pendant 5 min afin de limiter l'autofluorescence des aldéhydes libres. Les noyaux ont ensuite été marqués par incubation des cellules pendant 30 min dans du PBS contenant 0,5 % de BSA et du Hoechst (dilution 1/10000^{ème}) (Life Technologies). Pour finir, les cellules ont été lavées trois fois avec 500 μ L de PBS puis elles ont été visualisées au microscope à fluorescence (Zeiss) à l'objectif x63 sous immersion.

Pour l'immunomarquage, les cellules HeLa et MDBK ont étéensemencées dans des plaques Ibidi (100 000 cellules/puits) et infectées avec du BTV-8 (MOI = 0,01) pendant 24 h. Les cellules ont été fixées avec de la PFA 4 % pendant 30 min, lavées au PBS, incubées pendant 5 min avec une solution de PBS-glycine puis perméabilisées dans une solution de PBS-Triton pendant 5 min. Après 1 h de saturation dans du PBS + 1 % BSA, les cellules ont été incubées pendant 2 h avec les anticorps primaires appropriés (Tableau 6). Après 2 lavages au PBS, les cellules ont été mises en contact pendant 1 h avec les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome ainsi que du Hoechst pour marquer les noyaux. Après lavages au PBS, les cellules ont été observées au microscope à fluorescence comme décrit ci-dessus.

Tableau 6 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescences.

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution	Blocage
AlexaFluor 546	Lapin	Thermo-Fisher (A11035)	1/1 000 ^{ème}	PBS-BSA
AlexaFluor 488	Souris	Thermo-Fisher (A11029)	1/1 000 ^{ème}	PBS-BSA
BRAF	Souris	Cell Signaling (D9T6S, 14814)	1/50 ^{ème}	PBS-BSA
NS3	Lapin	Don de Dr. Frédérick Arnaud (Lyon)	1/1 000 ^{ème}	PBS-BSA

J. Titrages

Les titrages ont été réalisés à partir des surnageants de cellules HEK-293T infectées avec le BTV-8 (MOI = 0,01) et traitées à l'U0126 et effectués dans des plaques de culture de 96 puits. Tout d'abord, chaque suspension de virus à titrer a été diluée en cascade de 10 en 10 puis, 100 μ L de chaque dilution ont été déposés dans 6 cupules. Parallèlement, 100 μ L de milieu DMEM + GlutaMAX supplémenté ont été déposés dans une série de 6 cupules permettant de réaliser le témoin cellule de l'expérience. La suspension de cellules BSR (125 000 cellules/mL) a été préparée dans du milieu DMEM + GlutaMAX supplémenté, puis 100 μ L ont été déposés dans tous les puits en commençant par le témoin cellule, puis de la plus

faible dilution virale à la plus forte. Les plaques de culture ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂ pendant 4 jours. Ensuite, les cellules ont été fixées à l'aide d'une solution de cristal violet contenant 4 % de PFA puis incubées à température ambiante pendant 6 h. Après coloration, les cellules adhérentes apparaissent en violet et les cellules mortes, lysées par le virus, ont été éliminées lors de la fixation. Dans ce cas-là, un effet cytopathique (ECP) a été visualisé, caractérisé par l'absence d'un tapis cellulaire dans tout ou une partie du puits. Le titre viral a été calculé selon la méthode Reed et Muench [330] qui consiste à considérer un puits comme infecté si un ECP est observé dans 50 % au moins de la surface du tapis cellulaire. Les données représentées correspondent à la moyenne d'une expérience reproduite trois fois.

K. Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'ARN total a été extrait des culots cellulaires, obtenus à la suite d'infection de cellules HEK-293T avec le BTV-8 (MOI = 0,01) et traitées à l'U0126, en utilisant le kit RNeasy (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. La transcription inverse (RT) a ensuite été réalisée avec 1 µg d'ARN en utilisant le kit Reverse Transcription system (Promega) selon les instructions du fabricant. La PCR en temps réel (qPCR) a été réalisée avec 2 µL d'ADNc en utilisant le kit SYBR Green Master Mix (Roche) avec des oligonucléotides spécifiques décrits en **annexe 2**. Les échantillons d'ADNc ont été dénaturés pendant 15 min à 95 °C, puis les séquences ciblées ont été amplifiées pendant 40 cycles de 15 sec à 95 °C, 30 sec à 55 °C et 30 sec à 72 °C suivi d'une étape de refroidissement à 40 °C pendant 30 sec en utilisant l'appareil LightCycler 480 (Roche). L'ARNm de la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) a été utilisé pour normaliser les résultats.

L. Réactifs

1. Anticorps

Les anticorps utilisés dans l'ensemble de cette partie sont décrits dans le [Tableau 4](#) du chapitre 1 (page 104).

2. Inhibiteurs

L'inhibiteur U0126 (Promega) inhibe spécifiquement l'activité des protéines kinases MEK1/2 prévenant ainsi l'activation (phosphorylation) des protéines ERK1/2. Il a été resuspendu dans du DMSO selon les conditions du fournisseur. L'inhibiteur a été utilisé à 20 μ M pour le traitement des cellules en culture. En contexte infection, les cellules ont été traitées au moment de l'infection. En surexpression de NS3, les cellules ont été traitées à l'inhibiteur 6h après avoir été privées de sérum. Parallèlement, les mêmes conditions ont été réalisées avec du DMSO servant de contrôle négatif aux expériences.

L'inhibiteur GDC-0879 (Clinisciences) spécifique de la protéine kinase BRAF a été resuspendu dans du DMSO selon les conditions du fournisseur. Il a été utilisé à deux concentrations différentes (10 μ M et 20 μ M) pour le traitement des cellules en culture. En contexte infection et en surexpression de NS3, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées que celle appliquées pour l'U0126. Parallèlement, les mêmes conditions ont été réalisées avec du DMSO servant de contrôle négatif aux expériences.

III. RESULTATS

A. Effet du BTV sur la voie de signalisation MAPK/ERK

Pour déterminer si le BTV est capable de moduler la voie MAPK/ERK, nous avons évalué l'activation du facteur de transcription Elk-1 en utilisant le test luciférase rapporteur de l'activation de Elk-1 (Figure 34A). Pour ce faire, des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les plasmides pFA2-Elk1-DB, pGal4-UAS-Luc et pRL-CMV. 18 h p.t., les cellules ont été incubées avec du milieu DMEM + GlutaMAX non supplémenté afin de priver les cellules de facteur de croissance et infectées ou non soit avec une souche de BTV-8 WT à plusieurs MOIs (0,002 ; 0,01 ; 0,05) soit avec une souche de BTV-8 préalablement inactivée aux UVs (MOI = 0,05). Au bout de 6 h, les cellules ont été stimulées ou non avec 400 ng/mL d'EGF. Dans des cellules non infectées, l'ajout d'EGF induit l'activation de Elk-1 et donc une augmentation de l'activité de la luciférase d'un facteur d'environ 5. Les cellules infectées avec le BTV WT montrent une augmentation de l'activité de la luciférase d'un facteur 11

(pour une MOI = 0,002), 31 (MOI = 0,01) et 66 (MOI = 0,05) par rapport à la condition non infectée sans EGF démontrant ainsi une corrélation directe entre la MOI et l'activation de la voie (Figure 34B). Fait intéressant, en l'absence d'EGF, le virus est également capable d'activer la synthèse du gène rapporteur d'environ 27 fois (MOI = 0,05) par rapport aux cellules non infectées. En revanche, les cellules infectées avec le BTV-UVs montrent des niveaux de luciférase comparables à ceux observés dans les cellules non infectées. Ces résultats permettent de conclure que le virus sous sa forme répliquative est capable d'activer la voie MAPK/ERK en absence d'EGF et que la présence de l'EGF "boost" l'activation de la voie.

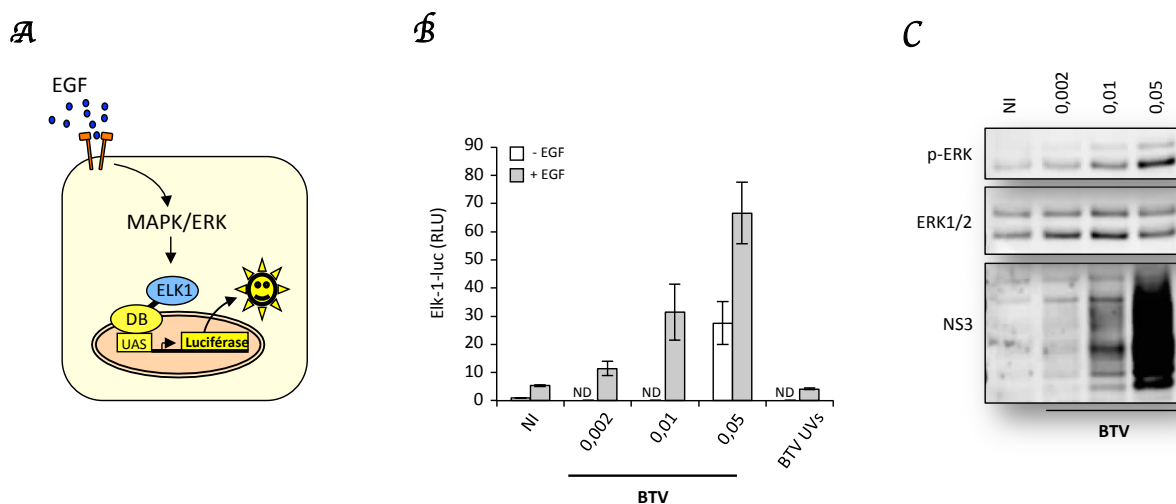


Figure 34 : Le BTV active la voie de signalisation MAPK/ERK.

(A) Représentation schématique du système de gène rapporteur luciférase permettant de quantifier l'activation de la voie MAPK/ERK. Dans ce système, un premier plasmide (Elk1-Gal4-DB) permet l'expression du facteur de transcription Elk-1 fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et un second plasmide contient une séquence promotrice du gène rapporteur luciférase (pGal4-UAS-Luc). La stimulation avec un facteur de croissance comme l'EGF induit l'activation de l'Elk-1 conduisant à l'induction de l'expression du gène rapporteur codant la luciférase. **(B)** Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les plasmides pFA2-Elk-1 (100 ng), pGal4-UAS-Luc (100 ng) et pRL-CMV (10 ng). Au bout de 18 h, le milieu a été retiré pour être remplacé par du milieu sans sérum et les cellules ont été infectées ou non à différentes MOIs. Comme contrôle, les cellules ont également été infectées avec du BTV-8 préalablement inactivé aux UVs (MOI = 0,05). Au bout de 6 h, les cellules ont été stimulées ou non avec 400 ng/mL d'EGF. 18 h post-stimulation, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicata et les écart-types ont été représentés. ND : non déterminé et NI : non infecté. **(C)** Des cellules MDBK ont été privées de sérum et simultanément infectées avec différentes MOIs de BTV-8 pendant 24 h, puis le niveau de phosphorylation des protéines ERK1/2, leur expression ainsi que celle de la protéine NS3 ont été déterminés à l'aide d'anticorps spécifiques par Western-Blot. NI : non infecté.

Comme le BTV est capable d'activer la voie MAPK/ERK dans des cellules humaines, nous avons vérifié s'il était également capable d'activer cette voie dans des cellules d'un de ses hôtes naturels. Pour ce faire, les cellules MDBK ont été privées de sérum et infectées ou non pendant 24 h avec du BTV WT aux mêmes MOIs que précédemment (0,002, 0,01 et 0,05) puis, la phosphorylation des protéines ERK1/2 a été mesurée par *Western-Blot* à l'aide d'un anticorps spécifique. Dans ces conditions (Figure 34C), le BTV induit la phosphorylation des protéines ERK1/2 de façon dose dépendante, démontrant ainsi que le BTV active également la voie MAPK/ERK dans des cellules bovines.

B. Impact des protéines virales sur la voie de signalisation MAPK/ERK

Comme le BTV active la voie de signalisation MAPK/ERK, nous avons souhaité identifier quelle(s) protéine(s) serai(en)t responsable(s) de l'effet observé. Pour ce faire, des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec le même système de gène rapporteur luciférase que celui utilisé pour la Figure 34A/B avec addition du plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné individuellement avec l'ensemble des ORFs du BTV-8. 18 h p.t., les cellules ont été privées de sérum pendant 6 h puis stimulées ou non avec 400 ng/mL d'EGF. Seules les protéines NS3 et NS3A sont capables d'induire, respectivement, l'expression de la luciférase d'un facteur 140 et 100 en absence d'EGF et d'un facteur 270 et 170 lors de l'ajout d'EGF en comparaison au contrôle pCiNeo-3xFLAG vide sans EGF (Figure 35). Ces résultats nous démontrent que les deux isoformes de la protéine NS3 activent la voie MAPK/ERK et, comme observé en contexte infectieux, la présence de l'EGF n'est pas indispensable pour l'activation de la voie par NS3.

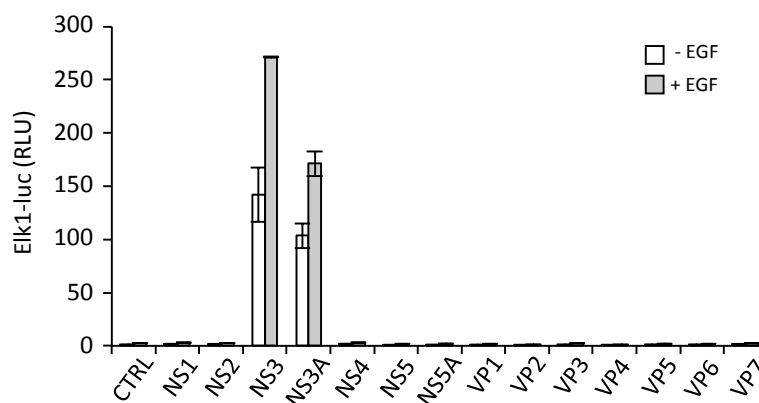


Figure 35 : Les protéines NS3/NS3A activent la voie de signalisation MAPK/ERK.

Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les plasmides pFA2-Elk-1 (100 ng), pGal4-UAS-Luc (100 ng), pRL-CMV (10 ng) et pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec les différents ORF du BTV-8 (300 ng). 18 h après transfection, les cellules ont été privées de sérum pendant 6 h puis stimulées ou non avec 400 ng/mL d'EGF. Après 18 h, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicata et les écart-types ont été représentés.

C. Etude de la phosphorylation des protéines ERK1/2 et eIF4E en contexte infectieux et NS3

Afin de confirmer l'effet de NS3 sur la voie MAPK/ERK au niveau endogène, nous avons étudié la phosphorylation des protéines ERK1/2. Pour cela, des cellules HEK-293T ont été transfectées avec le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné avec l'ORF NS3 de BTV-8. Au bout de 18 h, les cellules ont été privées de sérum pendant 6 h puis la phosphorylation de ERK1/2 a été détectée 10 min, 30 min, 2 h, 6 h et 24 h après stimulation à l'EGF par *Western-Blot*. Les résultats présentés [Figure 36A](#) montrent que la phosphorylation des protéines ERK1/2 est induite par l'EGF dans les cellules contrôles (pCiNeo-3xFLAG vide) avec un pic de phosphorylation à 10 min après stimulation puis le niveau de phosphorylation des protéines ERK1/2 diminue progressivement. Cette phosphorylation est augmentée en présence de NS3 par rapport au contrôle pCiNeo-3xFLAG vide même en absence d'EGF. Les mêmes résultats sont observés en contexte infectieux ([Figure 36B](#)).

Nous avons également étudié la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E, qui contrôle la traduction des ARNm, en utilisant un anticorps spécifique, afin d'étudier si la potentialisation de la voie MAPK/ERK par le BTV induit son activation. La

phosphorylation d'eIF4E est induite dans les cellules contrôles avec un pic observé entre 10 et 30 min après stimulation à l'EGF. La phosphorylation est également augmentée en présence de NS3 par rapport au contrôle pCiNeo-3xFLAG vide et ce niveau reste identique au cours du temps, au moins jusqu'à 24 h post-stimulation à l'EGF. Les mêmes observations peuvent être faites en contexte infectieux même si le niveau d'eIF4E phosphorylée est plus élevé dans le contexte où NS3 est surexprimée seule. L'ensemble de ces résultats confirme donc ceux obtenus par les tests luciférase démontrant l'implication de NS3 dans l'activation de la voie MAPK/ERK.

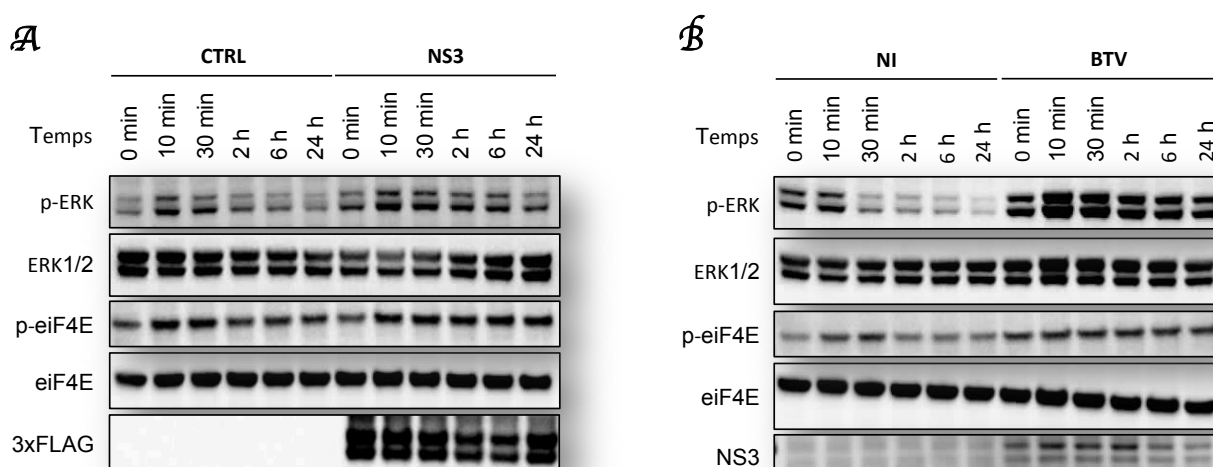


Figure 36 : Niveaux de phosphorylation des protéines ERK1/2 et eIF4E en contexte NS3 et infectieux.

(A) Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec l'ORF codant NS3 (300 ng) pendant 18 h. Les cellules ont ensuite été privées de sérum pendant 6 h puis stimulées ou non avec 400 ng/mL d'EGF. La phosphorylation des protéines ERK1/2 et du facteur de traduction eIF4E, leur expression ainsi que celle de NS3 ont été détectées 0 min, 10 min, 30 min, 2 h, 6 h et 24 h après stimulation. (B) Mêmes conditions expérimentales qu'en A mais cette fois-ci les cellules ont été privées de sérum et simultanément infectées avec du BTV-8 (MOI = 0,01). NI : non infecté.

D. Comparaison entre les sérotypes de BTV

Comme le BTV se compose de 27 sérotypes décrits, nous avons cherché à savoir si l'activation de la voie MAPK/ERK pouvait être différente en fonction du sérotype testé. En utilisant le même système rapporteur luciférase que précédemment, nous avons comparé la protéine NS3 de trois sérotypes de BTV : -8, -1 et -27. Les résultats présentés Figure 37A montrent qu'en absence d'EGF, les protéines NS3 de BTV-8, -1 et -27 induisent, respectivement, une augmentation de l'expression de la luciférase d'un facteur 66, 12 et 30 par rapport au contrôle pCiNeo-3xFLAG vide et l'ajout d'EGF induit la synthèse du gène

rapporteur d'un facteur 174 (NS3-BTV8), 89 (NS3-BTV1) et 177 (NS3-BTV27). Ces résultats permettent de démontrer qu'en plus du BTV-8, les protéines NS3 de deux autres sérotypes sont également capables d'activer la voie MAPK/ERK mais à des niveaux plus faibles, notamment pour NS3-BTV1. En effet, en absence d'EGF on observe que la protéine NS3 de BTV-1 et de BTV-27 active cinq et deux fois moins la voie MAPK/ERK par rapport à celle de BTV-8 et l'ajout d'EGF induit des niveaux d'activation identiques pour NS3-BTV27 mais pas pour NS3-BTV1 (deux fois moins d'activation) par rapport à NS3-BTV8.

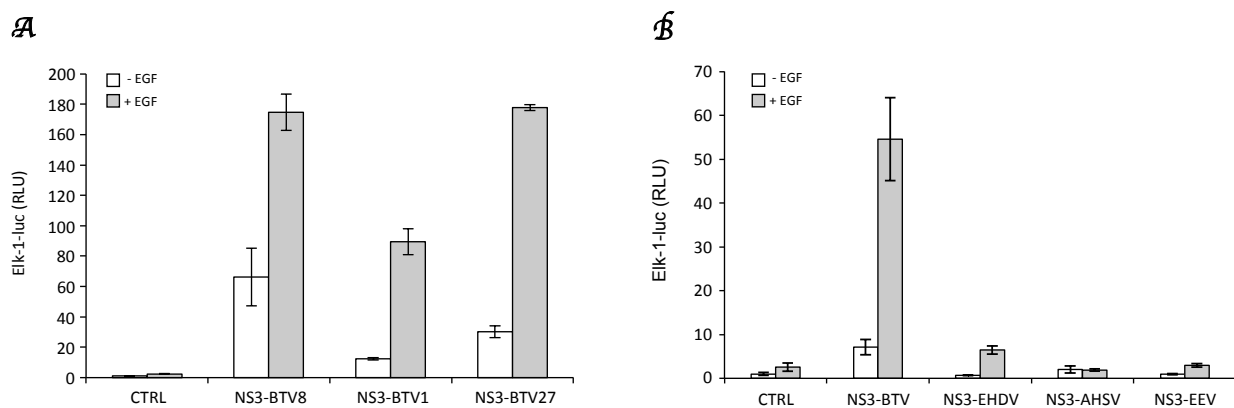


Figure 37 : Activation de la voie MAPK/ERK par la protéine NS3 : comparaison entre sérotypes de BTV et entre différents orbivirus.

(A) Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les plasmides pFA2-Elk-1 (100 ng), pGal4-UAS-Luc (100 ng), pRL-CMV (10 ng) et pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec les ORFs codant NS3 de différents sérotypes de BTV (300 ng). 18 h après transfection, les cellules ont été privées de sérum pendant 6 h puis stimulées ou non avec 400 ng/mL d'EGF. Après 18 h, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicate et les écart-types ont été représentés. **(B)** Mêmes conditions expérimentales qu'en **A** mais cette fois-ci les cellules ont été co-transfectées avec le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec les ORFs codant la protéine NS3 de quatre orbivirus : BTV, EHDV, AHSV et EEV (300ng).

E. Comparaison entre orbivirus

De la même façon, nous avons comparé la protéine NS3 de BTV à celles codées par l'EHDV (*Epizootic Hemorrhagic Disease Virus*), l'AHSV (*African Horse Sickness Virus*) et l'EEV (*Equine Encephalosis Virus*) dans leur capacité à induire la voie MAPK/ERK pour discriminer si cette fonction est partagée entre l'ensemble des membres du genre *Orbivirus*. En absence d'EGF, les protéines NS3 des trois orbivirus testées n'induisent pas d'augmentation de la luciférase par rapport aux cellules non infectées (Figure 37B). Lors de l'ajout d'EGF la même observation peut être faite cependant, une légère synthèse du gène rapporteur a lieu en présence de

NS3 de l'EHDV d'un facteur 6,5 par rapport au contrôle pCiNeo-3xFLAG vide sans EGF. Ces résultats indiquent donc que seule la protéine NS3 de BTV est capable d'activer fortement la voie MAPK/ERK en comparaison avec les autres protéines NS3 d'orbivirus testées.

F. Impact de différents fragments et mutant de NS3 sur la voie MAPK/ERK

Afin de cartographier la région au sein de NS3 responsable de l'activation de la voie MAPK/ERK, des fragments de NS3-BTV8 ont été générés : les fragments 1-117, 118-229 et Δ 118-182 (Figure 38A). Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec le même système rapporteur luciférase que précédemment additionnées du plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné avec l'ORF codant la protéine NS3-BTV8 entière (FL ou *full length*) ou trois de ces domaines. Comme déjà observé, NS3_{FL} est capable d'activer la synthèse du gène rapporteur luciférase d'un facteur 74 en absence d'EGF et 154 lors de l'ajout d'EGF. Les valeurs obtenues pour les trois fragments de NS3 restent par contre identiques à celle du contrôle pCiNeo-3xFLAG vide (Figure 38B), suggérant que la forme entière de la protéine serait requise pour activer la voie.

Afin d'étudier si la localisation de NS3 à la membrane plasmique et à l'appareil de Golgi est essentielle pour l'activation de la voie MAPK/ERK, nous avons testé le mutant ALL-EEE en position 131-133 de NS3-BTV8 (décrit dans l'introduction) qui est connu pour perdre ces deux localisations. Dans un premier temps, nous avons étudié la localisation cellulaire de ce mutant fusionné à une étiquette GFP dans des cellules HeLa par microscopie et, contrairement à NS3_{FL}, le mutant NS3_{ALL-EEE} présente une localisation diffuse dans toute la cellule (Figure 38C). Ce même mutant perd également sa capacité à activer la voie MAPK/ERK en absence d'EGF (Figure 38D). Ce résultat nous révèle que la présence de NS3 au niveau de la membrane plasmique et/ou de l'appareil de Golgi est probablement essentielle pour l'activation de la voie MAPK/ERK.

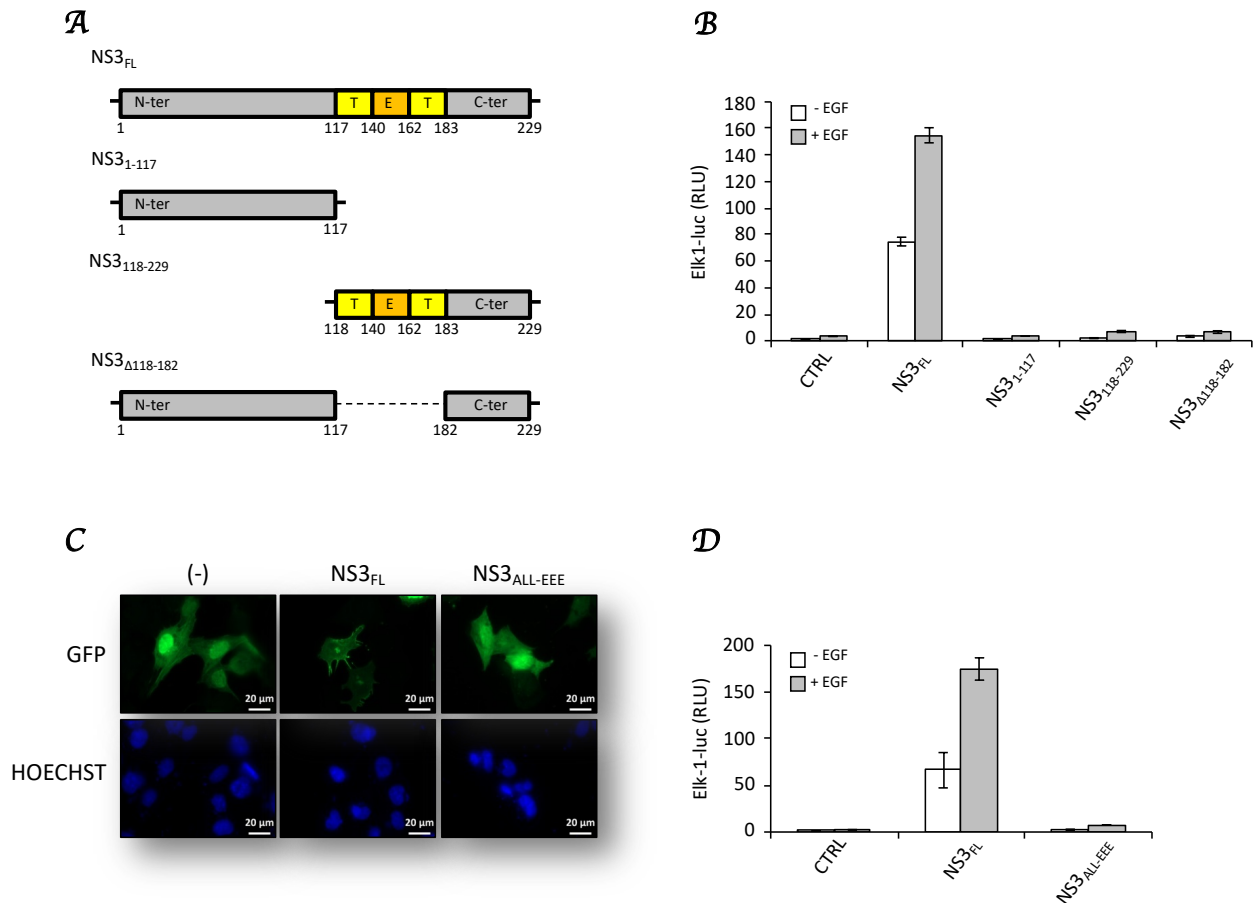


Figure 38 : Effet de différents fragments et mutant de NS3 sur la voie MAPK/ERK.

(A) Représentation schématique de la protéine NS3-BTV8 entière (FL) et trois de ses fragments contenant ou non les deux domaines transmembranaires (T) et le domaine extracellulaire (E). (B) Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les plasmides pFA2-Elk-1 (100 ng), pGal4-UAS-Luc (100 ng), pRL-CMV (10 ng) et pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombinaison avec la protéine NS3-BTV8 entière (FL) ou ses trois fragments (300 ng). 18 h après transfection, les cellules ont été privées de sérum pendant 6 h puis stimulées ou non avec 400 ng/mL d'EGF. Après 18 h, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicata et les écart-types ont été représentés. (C) Les cellules HeLa ont été transfectées avec le plasmide pEGFP-vide (-) ou recombinaison avec NS3_{FL}-BTV8 et NS3_{ALL-EEE}-BTV8 puis observées au microscope à fluorescence 24 h après transfection. Le Hoechst marque les noyaux en bleu et la barre d'échelle représente 20 μm (grossissement 63x). (D) Mêmes conditions expérimentales que B mais en y intégrant le mutant NS3_{ALL-EEE}-BTV8 (300 ng).

G. Niveau d'action de NS3 sur la voie MAPK/ERK

Pour identifier les mécanismes moléculaires expliquant l'activation de la voie MAPK/ERK par le BTV, l'inhibiteur U0126 qui bloque l'activité des protéines MEK1/2 a été testé à la fois en contexte infectieux et en surexpression de NS3. Pour cela, des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec l'ensemble des plasmides permettant de quantifier l'activation du facteur de transcription Elk-1 par essai luciférase additionnée, pour les conditions de surexpression, du plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné avec l'ORF codant NS3. Le lendemain, les cellules ont été privées de sérum et traitées à l'U0126. Pour les conditions d'infection, les cellules ont été infectées ou non avec le BTV-8 (MOI = 0,05) pendant 24 h et traitées simultanément à l'U0126 au moment où elles ont été privées de sérum. En parallèle, les mêmes conditions ont été réalisées en présence de DMSO servant de contrôle négatif à l'expérience. L'ajout de l'inhibiteur sur les cellules infectées bloque totalement l'expression de la luciférase par rapport au contrôle (DMSO) (Figure 39A). Les mêmes observations ont été faites en contexte NS3 (Figure 39B). Ces résultats ont pu être confirmés par *Western-Blot* révélant une perte totale de l'hyper-phosphorylation des protéines ERK1/2 en contexte infectieux et en surexpression de NS3 lors de la présence d'U0126 (Figure 39C/D). L'ensemble de ces données nous permet d'affirmer que le BTV, par l'intermédiaire de NS3, agit en aval du récepteur à l'EGF et en amont ou directement sur les protéines MEK1/2 pour activer la voie MAPK/ERK.

De plus, en étudiant l'expression de NS3 en contexte infectieux, nous observons que celle-ci est réduite en présence d'U0126 suggérant ainsi un impact de l'inhibiteur sur la réplication du BTV. Pour étayer cette hypothèse, les ARNs totaux des cellules HEK-293T infectées avec du BTV-8 à MOI = 0,01 ont été extraits pour quantifier l'ARNm de NS3 et de NS4 par RT-qPCR et les surnageants ont été récupérés pour réaliser des titrages du virus en cellules BSR. Les résultats révèlent huit fois moins de virus en présence de l'inhibiteur (Figure 39E) et une diminution de plus de 90 % de l'expression de l'ARNm de NS3 et de NS4 en présence de l'U0126 par rapport aux cellules infectées contrôles (DMSO) (Figure 39F). L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure d'une part que NS3 agit au niveau ou en amont des kinases MEK1/2, et d'autre part que la fonctionnalité de la voie MAPK/ERK est requise pour la réplication virale.

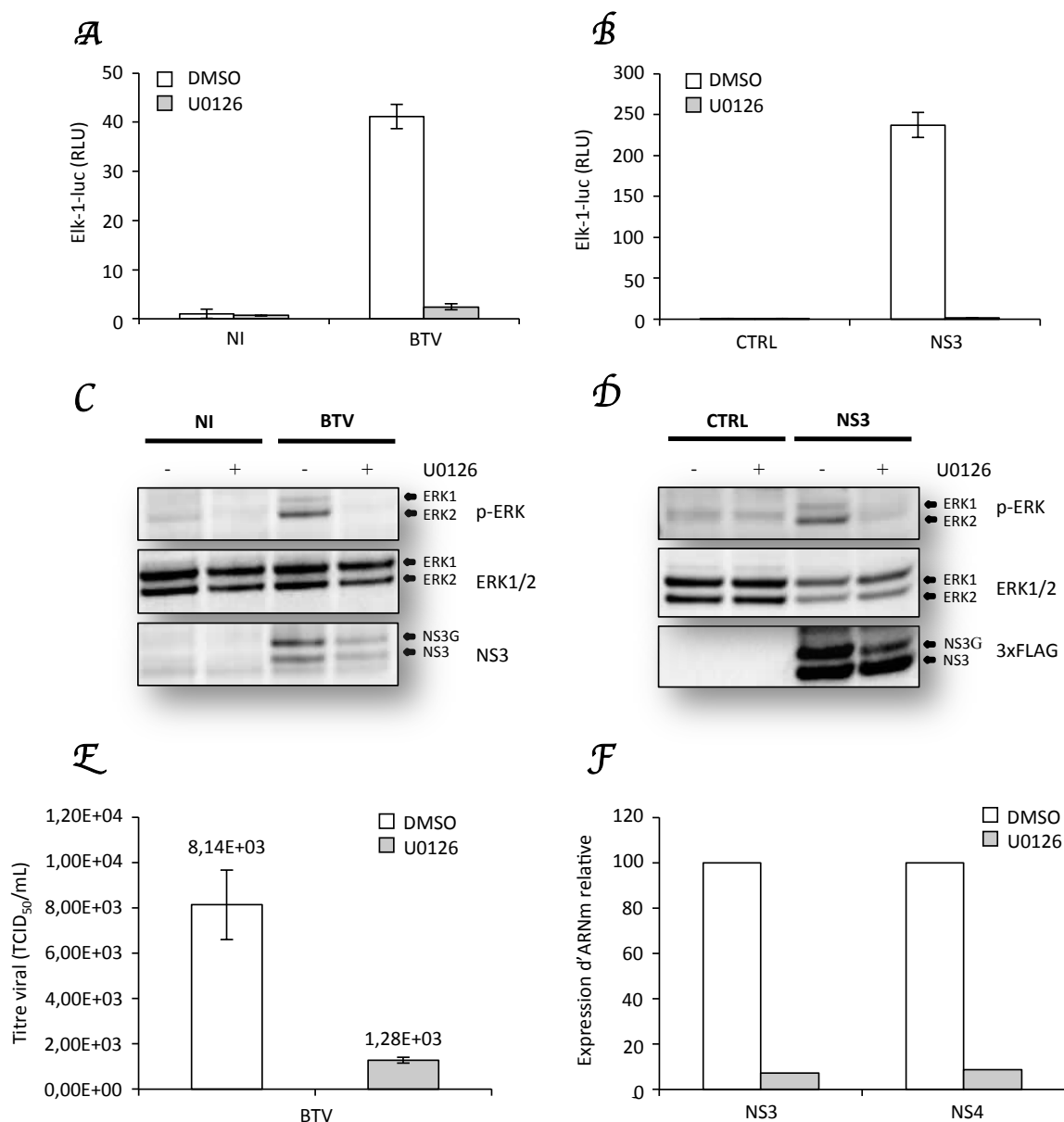


Figure 39 : L'U0126 empêche l'activation de la voie MAPK/ERK par la protéine NS3 et inhibe la réplication virale.

(A) Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les plasmides pFA2-Elk-1 (100 ng), pGal4-UAS-Luc (100 ng) et pRL-CMV (10 ng). 18 h après, les cellules ont été privées de sérum, infectées avec le BTV-8 (MOI = 0,05) et traitées avec l'U0126 (20 μ M). 18 h post-infection, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicata et les écart-types ont été représentés. NI : non infecté. (B) Mêmes conditions expérimentales qu'en A mais cette fois-ci les cellules ont été co-transfectées avec le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-BTV8 (300 ng). 18 h post-transfection, les cellules ont été privées de sérum pendant 6 h et traitées avec l'U0126 (20 μ M). (C) Le milieu de culture des cellules HEK-293T a été remplacé par du milieu sans sérum et simultanément prétraitées avec l'U0126 (20 μ M). Au bout de 2 h, les cellules ont été infectées avec du BTV-8 (MOI = 0,01) et traitées avec l'U0126 (20 μ M). 24 h post-infection, le niveau de phosphorylation des protéines ERK1/2, leur expression ainsi que celle de la protéine NS3 ont été déterminés à l'aide d'anticorps spécifiques par *Western-Blot*. NI : non infecté. (D) Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec le pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-BTV8. 18 h post-transfection, les cellules ont été privées de sérum puis traitées au bout de 6 h avec l'U0126 (20 μ M). Le lendemain, le niveau de phosphorylation des protéines ERK1/2, leur expression ainsi que celle de la protéine NS3 ont été déterminés à l'aide d'anticorps spécifiques par *Western-Blot*. (E) Titrages des surnageants de (C) réalisés dans des cellules BSR. Ils ont été réalisés en triplicata et les écart-types ont été représentés. (F) Des culots cellulaires de (C) ont été utilisés afin d'extraire l'ARN et d'effectuer des RT-qPCR pour quantifier le niveau des transcrits d'ARNm codant NS3 et NS4 à l'aide d'amorces spécifiques.

H. Identification du compartiment cellulaire à l'origine de l'activation de la voie MAPK/ERK par NS3-BTV

Comme mentionné dans l'introduction (partie II.B.2 page 70), la voie MAPK/ERK peut-être activée au niveau de trois compartiments cellulaires principaux : la membrane plasmique, l'appareil de Golgi et les endosomes. Cette compartimentation s'effectue par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage : KSR pour la membrane plasmique, Sef pour l'appareil de Golgi et MP1 pour les endosomes. Pour essayer d'identifier le compartiment cellulaire à l'origine de l'activation de la voie par NS3, nous avons utilisé différents siARNs ciblant l'expression de GRB2, KSR, MP1, Sef et RasGRP1. Ces siARNs ont été transfectés séparément dans des cellules HEK-293T, 24 h avant d'être co-transfectées avec l'ensemble des plasmides permettant le test MAPK/ERK luciférase ainsi que le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné avec l'ORF codant NS3. Le lendemain, les cellules ont été privées de sérum pendant 24 h. Seule l'extinction de la protéine RasGRP1 diminue d'environ 70 % l'expression de la luciférase comparée au siARN contrôle, suggérant une activation majoritaire au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 40A). Parallèlement, nous avons confirmé l'efficacité du siARN RasGRP1 par RT-qPCR et avons observé une diminution de 50 % de l'expression de l'ARNm de RasGRP1 en présence du siARN par rapport aux cellules contrôles (siARN contrôle) (données non montrées).

Afin de confirmer les résultats obtenus par essai luciférase, nous avons étudié le niveau de phosphorylation des protéines ERK1/2 par *Western-Blot* en contexte infectieux (BTV-8) et en surexpression de NS3-BTV8 après extinction de RasGRP1. Pour ce faire, des cellules HEK-293T ont été transfectées avec le siARN RasGRP1 ou contrôle pendant 24 h, puis infectées avec le BTV-8 WT (MOI = 0,05) ou transfectées avec le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-BTV8 et, ce pendant 24 h. En contexte infectieux, on observe une légère diminution de la phosphorylation des protéines ERK1/2 lors de l'extinction de la protéine RasGRP1 comparée aux cellules contrôles (siARN contrôle) tandis que cette diminution est bien plus marquée dans le contexte NS3-BTV8 (Figure 40B). Ces résultats confirment donc ceux obtenus précédemment en test luciférase et suggèrent une activation de la voie MAPK/ERK par NS3 prédominante au niveau de l'appareil

de Golgi.

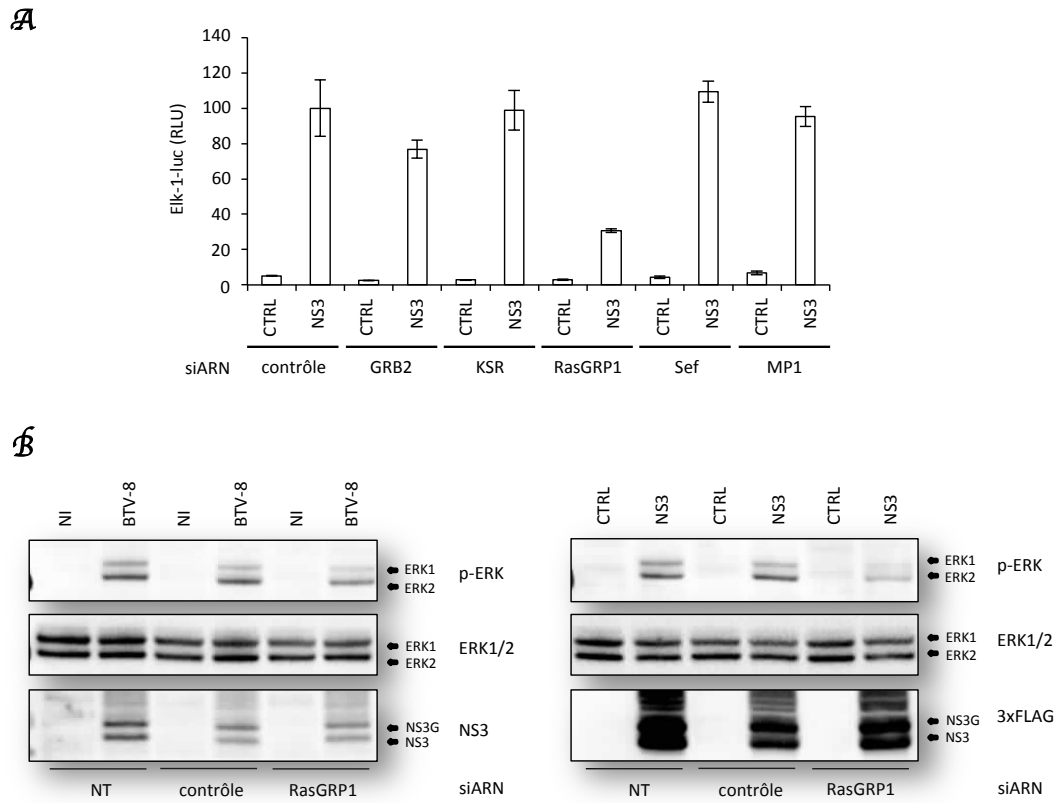


Figure 40 : Lien entre compartimentation cellulaire et activation de la voie MAPK/ERK par NS3.

(A) Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec des siARNs contrôle, GRB2, KSR, RasGRP1, Sef et MP1 (50 nM) pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été co-transfectées avec les plasmides pFA2-Elk-1 (100 ng), pGal4-UAS-Luc (100 ng), pRL-CMV (10 ng) et pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-BTV8 (300 ng). 18 h après transfection, les cellules ont été privées de sérum pendant 6 h puis stimulées ou non avec 400 ng/mL d'EGF. Après 18 h, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicata et les écart-types ont été représentés. (B) Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec des siARNs contrôle ou RasGRP1 (50 nM) pendant 24 h. Elles ont ensuite été infectées avec du BTV-8 (MOI = 0,05) (panel de gauche) ou transfectées avec le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-BTV8 (panel de droite) pendant 24 h. Le niveau de phosphorylation des protéines ERK1/2, leur expression ainsi que celle de la protéine NS3 ont été déterminés à l'aide d'anticorps spécifiques par *Western-Blot*. NI : non infecté.

I. Identification de BRAF comme interacteur de NS3-BTV

Une approche de spectrométrie de masse en contexte infectieux et en surexpression de NS3 a été réalisée afin d'identifier des nouveaux partenaires cellulaires de NS3. Pour cela, des cellules HEK-293T ont été transfectées avec le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-BTV8 pendant 24 h ou infectées avec du BTV-8 à MOI = 0,1 pendant 18 h. Les complexes protéiques associées à NS3 ont été purifiés par co-

immunoprécipitation et déposés sur gel d'électrophorèse NuPAGE pour être analysés par spectrométrie de masse par la plateforme de protéomique/spectrométrie de masse de l'Institut Jacques-Monod. Parmi les protéines cellulaires identifiées, la protéine kinase BRAF, qui est la MAP3K principale impliquée dans l'activation de la voie MAPK/ERK, présentait un score Mascot de 104 (contexte NS3 seule) et 64 (contexte infectieux), suggérant une probable interaction entre NS3 et BRAF. Le détail de la séquence des peptides identifiés pour BRAF est présenté en **annexe 7**.

Cette interaction a ensuite été validée par GST *pull-down* avec la protéine BRAF endogène. Pour cela, des cellules HEK-293T ont été transfectées avec l'ORF codant NS3 fusionnée à l'étiquette GST pendant 48 h, puis les complexes protéiques associés à NS3 ont été purifiés par GST *pull-down* et analysés par *Western-blot* à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre BRAF. La [Figure 41A](#) montre que BRAF interagit avec NS3-BTV8 et ne se lie pas à la GST seule révélant ainsi une interaction spécifique entre NS3 et BRAF. De plus, NS3-BTV27 s'est également révélée interagir avec BRAF démontrant ainsi que cette interaction est conservée entre les deux sérotypes de BTV ([Figure 41A](#)). De plus, les trois mêmes fragments de NS3 que ceux utilisés précédemment ([Figure 38A](#)) ont également été testés et ils n'interagissent pas avec BRAF ([Figure 41B](#)). Les résultats générés avec les fragments de NS3 suggèrent qu'il pourrait exister une corrélation entre la capacité ou non d'interagir avec BRAF et l'activation de la voie MAPK/ERK par la protéine NS3.

Nous avons ensuite étudié si l'interaction NS3-BRAF était conservée entre les différents orbivirus. Pour cela, les protéines NS3 de l'EHDV, de l'AHSV et de l'EEV ont été testées de la même façon que décrite ci-dessus. L'interaction de BRAF avec la protéine NS3 de BTV-8 est bien confirmée cependant, aucune interaction n'est détectée entre BRAF et la protéine NS3 des trois orbivirus testés ([Figure 41C](#)). Ces résultats permettent donc de conclure que l'interaction NS3-BRAF est spécifique au BTV et pourrait expliquer pourquoi aucune activation de la voie MAPK/ERK n'a été observée lors des essais luciférase réalisés avec NS3 de ces trois orbivirus ([Figure 37B](#)).

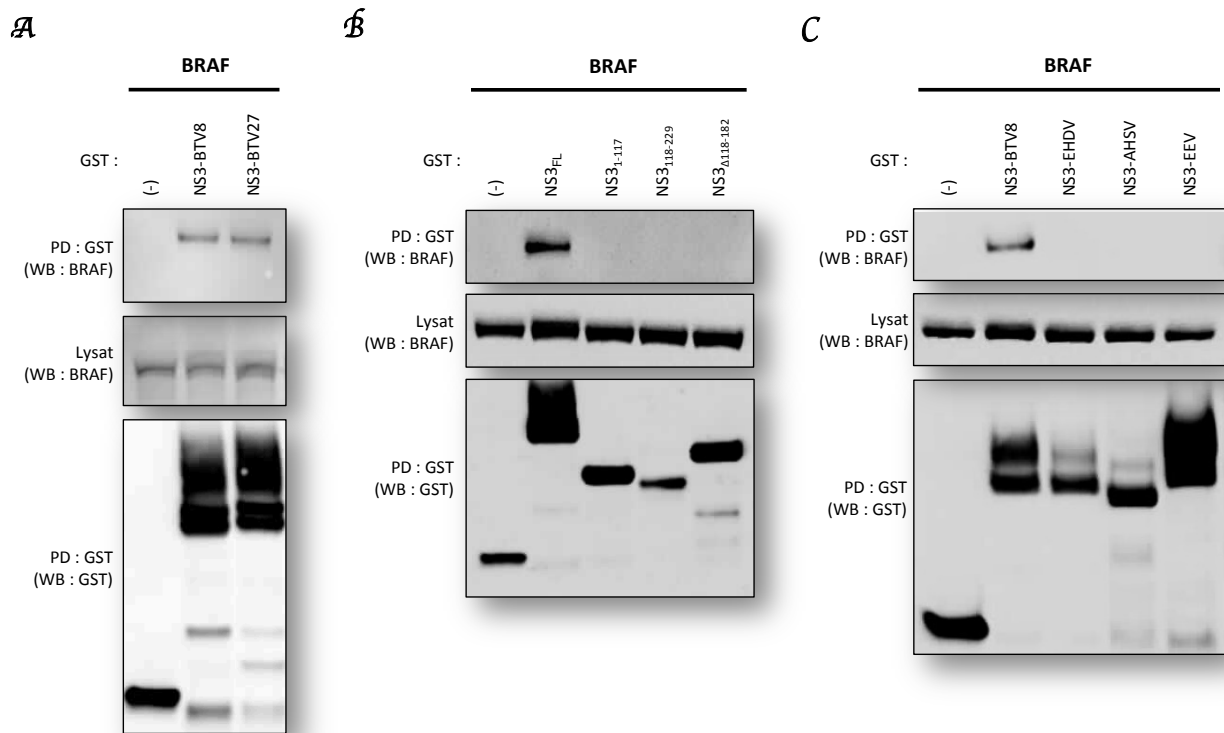


Figure 41 : Interaction de la protéine cellulaire BRAF avec NS3.

(A) Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec 1 µg des vecteurs exprimant la GST fusionnée ou non (-) aux protéines NS3-BTV8 et NS3-BTV27 pendant 48 h. Les lysats ont été récupérés 48 h après transfection et purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. Les protéines fusionnées à l'étiquette GST ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-GST et l'expression de la protéine BRAF a été déterminée à l'aide d'un anticorps spécifique par *Western-Blot*. (B) Mêmes conditions expérimentales qu'en A mais cette fois-ci les cellules ont été transfectées avec 500 ng des vecteurs exprimant la GST fusionnée ou non (-) à NS3-BTV8 entière (FL) ou ses trois fragments. (C) Mêmes conditions expérimentales qu'en A mais cette fois-ci les cellules ont été transfectées avec 500 ng des vecteurs exprimant la GST fusionnée ou non (-) à NS3-BTV8, NS3-EHDV, NS3-AHSV ou NS3-EEV. PD : Pull-Down, WB : Western-Blot.

Comme BRAF interagit avec NS3, nous avons étudié leur localisation subcellulaire respective dans des cellules HeLa et MDBK. Pour ce faire, les cellules ont été infectées pendant 24 h avec du BTV-8 (MOI = 0,01), fixées et les protéines NS3 et BRAF ont été immunomarquées par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques. Dans les cellules HeLa et MDBK, BRAF possède une localisation ponctiforme dans le cytoplasme des cellules (Figure 42). En contexte infectieux, la localisation de BRAF est modifiée marquant davantage l'appareil de Golgi (cellules HeLa et MDBK) mais également la membrane plasmique (majoritairement les cellules MDBK), correspondant aussi à la localisation subcellulaire de NS3. Ces observations suggèrent que BRAF serait relocalisée en présence de NS3 confirmant ainsi l'interaction NS3-BRAF.

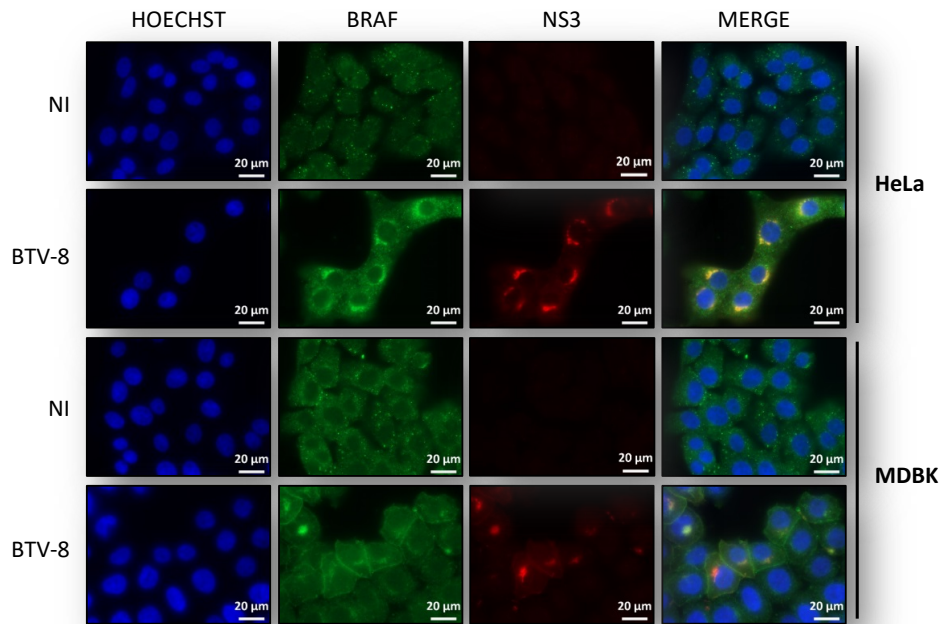


Figure 42 : Etude de la localisation de la protéine BRAF et NS3.

Des cellules HeLa (panel haut) et MDBK (panel bas) ont été infectées avec du BTV-8 (MOI = 0,01) pendant 24 h. Les protéines BRAF et NS3 peuvent être visualisées par immunofluorescence (BRAF en vert et NS3 en rouge) à l'aide d'anticorps spécifiques. Le noyau a été marqué au Hoechst (bleu) et la barre d'échelle représente 20 µm (grossissement 63x). NI : non infecté.

J. L'interaction NS3-BRAF est responsable de l'activation de la voie MAPK/ERK

Afin de confirmer que l'activation de la voie MAPK/ERK par la protéine NS3 passe par son interaction avec la protéine kinase BRAF, nous avons testé l'impact d'un inhibiteur spécifique de BRAF, le GDC-0879. En utilisant les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées précédemment pour l'U0126, nous avons pu montrer que l'expression de la luciférase est fortement diminuée dans les cellules traitées au GDC-0879 par rapport aux cellules contrôles DMSO (Figure 43A). En effet, l'expression de la luciférase en contexte NS3 passe d'un facteur 61 dans les conditions contrôles (DMSO) à un facteur 25 (10 µM de GDC-0879) et 14 (20 µM de GDC-0879) en présence de GDC-0879.

Par la suite, les résultats de ces tests luciférase ont été confirmés par *Western-Blot*. En effet, la phosphorylation des protéines ERK1/2 est diminuée en présence du GDC-0879 et ceci est corrélé à la quantité d'inhibiteur utilisée même si cette réduction n'est pas aussi forte que celle observée dans le cas de l'U0126 (Figure 43B). De plus, la phosphorylation

d'elF4E est davantage diminuée en présence de l'U0126 qu'en présence du GDC-0879. Enfin, à l'inverse de l'U0126, le GDC-0879 ne semble avoir aucun effet sur la réplication du BTV car l'expression de NS3 est identique à la condition contrôle en présence de DMSO.

Pour confirmer d'une seconde façon que l'activation de la voie MAPK/ERK par NS3 passe par BRAF, nous avons mesuré l'activation de la voie à la fois en contexte infectieux et NS3 après extinction du gène codant BRAF à l'aide d'un siARN spécifique. Tout d'abord, l'efficacité du siARN BRAF a été étudiée par *Western-Blot* en utilisant un anticorps spécifique de BRAF, 72 h p.t. de celui-ci dans des cellules HEK-293T. Une forte diminution de BRAF a été observée dans les cellules déplétées confirmant ainsi l'efficacité du siARN (données non montrées). Suite à cette validation, des cellules HEK-293T ont été traitées pendant 24 h avec le siARN BRAF ou contrôle, puis co-transfectées avec l'ensemble des plasmides permettant le test rapporteur luciférase ainsi que, pour les conditions de surexpression, le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné avec l'ORF codant NS3. Le lendemain, les cellules ont été privées de sérum et, pour les conditions d'infection, infectées avec le BTV-8 à MOI = 0,01 pendant 24 h. En contexte infectieux nous constatons que l'extinction de BRAF diminue de 70 % l'expression de la luciférase comparée au contrôle négatif (siARN contrôle) (Figure 43C). En contexte NS3, nous observons une diminution de plus de 80 % de l'expression de la luciférase en présence du siARN BRAF par rapport au contrôle (Figure 43D). De plus, les résultats obtenus par essai luciférase ont été confirmés par *Western-Blot* révélant une nette diminution de la phosphorylation des protéines ERK1/2 en présence du siARN BRAF en contexte infectieux et en surexpression de NS3, ainsi qu'une nette diminution de l'expression de BRAF (Figure 43E/F). L'ensemble des résultats démontre que BRAF joue un rôle essentiel dans l'activation de la voie MAPK/ERK médiée par NS3.

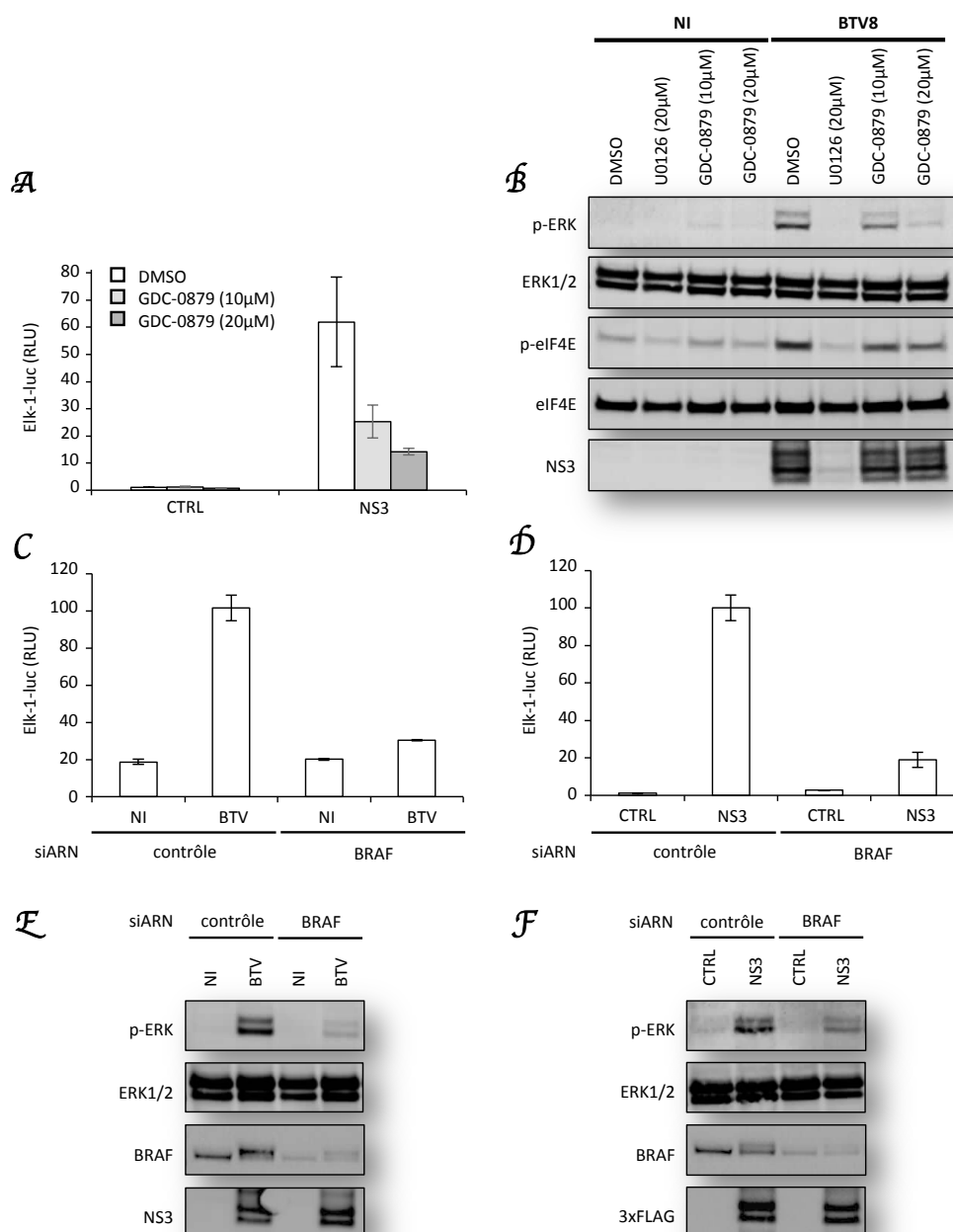


Figure 43 : Impact de l'inhibiteur GDC-0879 et de l'absence de BRAF sur l'activation de la voie MAPK/ERK en contexte infectieux et NS3.

(A) Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les plasmides pFA2-Elk-1 (100 ng), pGal4-UAS-Luc (100 ng), pRL-CMV (10 ng) et pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-BTV8 (300 ng). 18 h post-transfection, les cellules ont été privées de sérum pendant 6 h puis traitées au GDC-0879 (10 ou 20 μM). Au bout de 18 h, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicata et les écart-types ont été représentés. (B) Les cellules HEK-293T ont été privées de sérum simultanément à leur infection avec du BTV-8 (MOI = 0,01) et leur traitement au GDC-0879 (10 et 20 μM) et à l'U0126 (20 μM). 24 h post-infection, le niveau de phosphorylation des protéines ERK1/2, leur expression ainsi que celle de la protéine NS3 ont été déterminés à l'aide d'anticorps spécifiques par *Western-Blot*. NI : non infecté. (C-D) Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec des siARNs contrôle ou BRAF (50 nM) pendant 24 h, puis co-transfectées avec les plasmides pFA2-Elk-1 (100 ng), pGal4-UAS-Luc (100 ng), pRL-CMV (10 ng) (C-D) et additionné du plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-BTV8 (300 ng) (D). 18h post-transfection, les cellules ont été privées de sérum (C-D) et infectées avec du BTV-8 (MOI = 0,01) (C). Au bout de 18 h, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicata et les écart-types ont été représentés. Parallèlement, le niveau de phosphorylation des protéines ERK1/2, leur expression ainsi que celle de la protéine NS3 et de BRAF ont été déterminés à l'aide d'anticorps spécifiques par *Western-Blot* (E-F).

K. Lien entre l'activation de la voie MAPK/ERK et l'inhibition de la réponse IFN- α/β ?

Comme mentionné dans l'introduction, avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe du Dr. Damien Vitour a démontré que la protéine NS3 bloque la voie de signalisation des IFN- α/β . Certaines études démontrent que l'activation de la voie MAPK/ERK peut induire le blocage de la voie des IFN- α/β [295]. C'est pourquoi, nous avons cherché à savoir si la modulation de ces deux voies de signalisation par la protéine NS3 de BTV avait un quelconque lien. Pour cela, nous avons testé l'impact sur le promoteur IFN- β des trois fragments de NS3 (1-117, 118-229 et Δ 118-182 décrit [Figure 38A](#)) pour lesquels il n'a pas été observé d'effet sur la voie MAPK/ERK. Dans cette optique, des cellules HEK-293T ont été transfectées avec le plasmide pIFN- β -Luc codant le promoteur IFN- β -luciférase, le plasmide p Δ RIG-I codant la forme active de RIG-I (N Δ -RIG-I), le plasmide pRL-CMV-renilla ainsi que le plasmide pCiNeo-3xFLAG vide (contrôle négatif) ou recombiné avec l'ORF codant NS3_{FL} ou ses fragments. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus [Figure 38B](#) montrant l'impact de NS3_{FL} sur la voie MAPK/ERK. La protéine NS3_{FL} induit d'une part l'augmentation de la luciférase révélant l'activation du facteur de transcription Elk-1 et d'autre part bloque l'expression du gène codant la luciférase démontrant l'inhibition du promoteur IFN- β ([Figure 44A](#)). Le fragment 1-117 n'active pas la voie MAPK/ERK et ne bloque pas la voie des IFN- α/β et les fragments 118-229 et Δ 118-182 n'activent pas la voie MAPK/ERK et inhibent partiellement la voie des IFN- α/β . Comme les fragments 118-229 et Δ 118-182 de NS3 n'activent pas la voie MAPK/ERK et induisent un blocage partiel de la voie des IFN- α/β , on peut supposer qu'il n'existe pas de lien entre les deux voies.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons testé l'impact de l'inhibiteur U0126 spécifique des protéines MEK1/2 et de l'inhibiteur GDC-0879 spécifique de BRAF sur l'inhibition de la voie des IFN- α/β par NS3. Pour cela, des cellules HEK-293T ont été transfectées avec l'ensemble des plasmides permettant de quantifier l'activation du promoteur IFN- β comme décrit ci-dessus puis traitées avec 20 μ M d'inhibiteur U0126 ou GDC-0879 pendant 24 h. Comme le montre les résultats ([Figure 44B/C](#)), la présence de l'un ou l'autre des inhibiteurs ne restaure pas l'activation de la voie des IFN- α/β suite à son blocage par NS3. Ces résultats sont donc en accord avec les précédents révélant ainsi que les deux fonctions portées par

NS3 ne sont probablement pas liées.

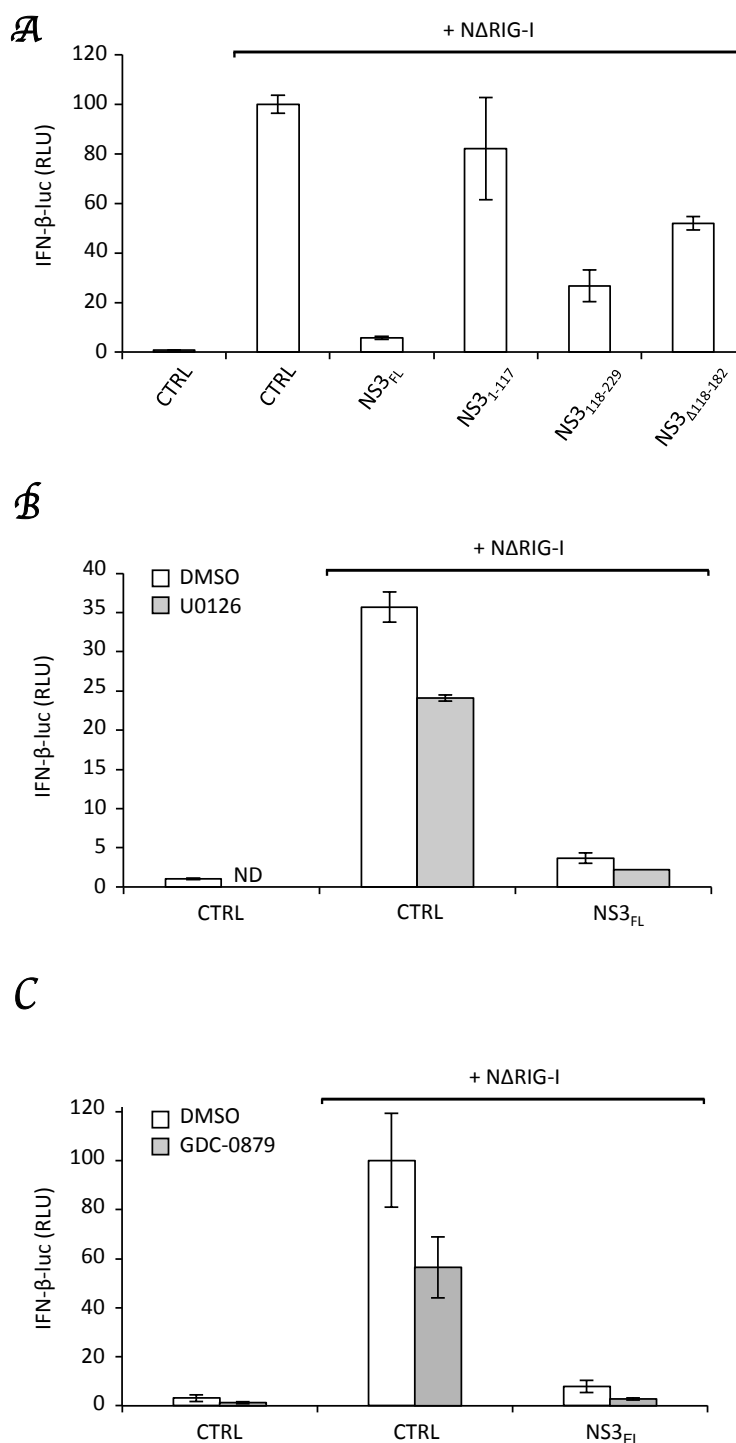


Figure 44 : Etude du potentiel lien entre activation de la voie MAPK/ERK et inhibition de la voie des IFN-α/β.

(A) Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les plasmides pIFN-β-Luc (100 ng), pΔRIG-I (100 ng), pRL-CMV (10 ng) et pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-BTV8 entière (FL) ou des fragments (300 ng) présentés en Figure 38A. 24 h après transfection, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicata et les écart-types ont été représentés. (B-C) Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les plasmides pIFN-β-Luc (100 ng), pΔRIG-I (100 ng), pRL-CMV (10 ng) et pCiNeo-3xFLAG vide (CTRL, 300 ng) ou recombiné avec l'ORF codant NS3-FL-BTV8 (300 ng). 24 h post-transfection, les cellules ont été traitées avec 20 μM d'inhibiteur U0126 (B) ou GDC-0879 (C) puis au bout de 24 h, les activités relatives de la firefly et de la *Renilla* luciférase ont été déterminées. Les conditions ont été réalisées en triplicata et les écart-types ont été représentés. ND : non déterminé.

IV.DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nous avons montré que le BTV est capable d'activer la voie MAPK/ERK, phénomène déjà observé dans une étude [307] mais non confirmé dans deux autres [308,309]. Ces différences de résultats peuvent provenir des conditions expérimentales distinctes. En effet, les cellules (HEK-293T, HeLa et BSR) et les cinétiques d'infection (3 h, 24 h et 36h p.i.) utilisées ne sont pas les mêmes. De plus, nos résultats ont été obtenus en privant les cellules de facteur de croissance. Or, dans les deux études ne démontrant aucun impact du BTV sur la voie, ces conditions n'ont pas été appliquées, masquant probablement, ou du moins partiellement, l'impact du BTV sur la voie MAPK/ERK. De plus, les sérotypes utilisés (BTV-1 et -10) diffèrent du BTV-8 employé dans notre étude. Aucune activation de la voie n'a été révélée en présence du BTV-1, qui dans nos expériences, a induit des niveaux d'activation de la cascade de signalisation moins importants comparés à ceux du BTV-8. L'étude de la phosphorylation des protéines ERK1/2 par le BTV-1 et le BTV-8 semblerait révéler que le BTV-1 induit moins de phosphorylation des protéines ERK1/2 en absence d'EGF par rapport au BTV-8 et l'effet semblerait similaire lors de l'ajout d'EGF.

Nous avons démontré pour la première fois que le BTV, par l'intermédiaire de NS3, est capable d'activer la voie MAPK/ERK en absence de toute stimulation à l'EGF. Ce mécanisme est différent d'autres protéines virales telles que la protéine C du virus parainfluenza de type 3 (HPIV-3) qui nécessite la présence de l'EGF pour une activation forte de la cascade de signalisation [331]. De plus, nous avons révélé que l'effet de NS3 ne semble pas dépendre du sérotype car la protéine NS3 des sérotypes 1 et 27 est également capable de potentialiser la voie même si le niveau d'activation semble moins fort pour NS3-BTV1. En outre, nous avons observé que des fragments ou mutation de la protéine n'induisent aucune activation. Ces résultats démontrent que :

- la protéine NS3 entière semble être requise pour réguler efficacement l'activation de cette voie. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, il serait probablement nécessaire de tester d'autres fragments de NS3 (plus grand) qui ne seraient délétés que de quelques acides aminés,
- la localisation ou l'ancrage de NS3 à la membrane d'un compartiment cellulaire

(membrane plasmique ou appareil de Golgi) paraît essentielle pour l'activation.

Pour caractériser les mécanismes moléculaires expliquant l'activation de la voie MAPK/ERK par le BTV, l'inhibiteur U1026 a été utilisé. Celui-ci s'est révélé capable d'induire un blocage total de l'activation de la voie suite à sa potentialisation par le BTV ou par la protéine NS3 démontrant ainsi que NS3 agit en aval du récepteur à l'EGF et en amont ou directement sur les protéines MEK1/2. Étant donné qu'une partie au sein de la cascade de signalisation a pu être déterminée comme domaine minimum d'interaction, nous avons souhaité identifier le(les) partenaire(s) cellulaire(s) de NS3 responsable(nt) de l'activation de la voie MAPK/ERK. Les résultats de nos cribles double-hybride en levure n'ont identifié aucun partenaire de NS3 impliqué dans cette cascade de signalisation. Cependant, une recherche des partenaires de NS3 par co-immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse nous a permis d'identifier la protéine kinase BRAF comme interacteur de NS3. L'interrogation qui peut donc se poser est pourquoi nous n'avons pas identifié BRAF ou toute autre protéine de la voie comme partenaire de NS3 lors de nos cribles double-hybride en levure mais uniquement par des études de spectrométrie de masse ? Deux explications peuvent être formulées :

- 1) nous avons démontré par GST *pull-down* qu'il semblerait que seule la protéine NS3 entière soit capable de lier BRAF. Or, les cribles double-hybride n'ont révélé aucun interacteur lorsque la protéine NS3 entière avait été utilisée comme appât. En effet, la majorité des interactions identifiées par Y2H ont été obtenus avec le domaine $\Delta 118-182$ de NS3 qui lors de nos validations biochimiques par GST *pull-down*, ne montre pas d'interaction avec BRAF,
- 2) une seconde possibilité serait que BRAF ne soit tout simplement pas ou peu présent dans notre banque MDBK expliquant pourquoi nous ne l'avons pas identifié lors de nos cribles. De plus, les étiquettes utilisées pour le double-hybride peuvent peut-être gêner pour identifier cette interaction.

L'interaction de BRAF avec la protéine NS3 de BTV-8 a pu être confirmée par co-purification d'affinité en utilisant la technique de GST *pull-down* et s'est également révélée conservée avec la protéine NS3 de BTV-27. Parallèlement, les mutants de délétion de NS3 utilisés n'ont

pas montré d'interaction avec BRAF laissant supposer une corrélation entre la capacité d'interagir avec BRAF et l'activation de la voie MAPK/ERK.

De plus, les protéines NS3 des trois orbivirus testées (EHDV, AHSV et EEV) n'interagissent pas avec BRAF et ne sont pas capables d'activer la voie MAPK/ERK démontrant à nouveau qu'une absence d'activation de la voie semble être liée à une absence de liaison avec BRAF. Ces résultats nous laissent donc supposer que le BTV pourrait être le seul membre du genre *Orbivirus* à induire l'activation de la voie MAPK/ERK lui conférant ainsi une spécificité.

L'utilisation de l'inhibiteur GDC-0879 a confirmé l'importance de BRAF dans l'activation de la voie MAPK/ERK par NS3. En revanche et à l'inverse de l'U0126, l'inhibition de la phosphorylation des protéines ERK1/2 et eIF4E n'était pas totale dans les cellules traitées au GDC-0879 et exprimant NS3. De plus, des titrages réalisés en présence du GDC-0879 (données non montrées) n'ont révélé aucun impact de cet inhibiteur sur la réplication du virus contrairement à l'U0126. L'ensemble de ces résultats sont autant d'arguments en faveur du rôle important de NS3 au cours du cycle viral qui, au travers du détournement de la voie MAPK/ERK, pourrait augmenter la survie cellulaire et la traduction au profit de la réplication virale. Des faits similaires ont été observés pour un grand nombre de virus (cf. **annexe 1**, liste non exhaustive) démontrant, par l'intermédiaire d'inhibiteurs spécifiques de cette voie, le « piratage » de la voie MAPK/ERK par les virus en faveur de leur réplication et leur propagation dans l'organisme.

L'utilisation du siARN BRAF nous permet de confirmer l'implication de l'interaction NS3-BRAF pour l'activation de la voie en observant une nette diminution de la phosphorylation des protéines ERK1/2, démontrant pour la première fois que BRAF est une cible directe d'un virus pour l'activation de la voie MAPK/ERK. Cependant, comme l'inhibition ne semble pas totale en présence du siARN cela laisse supposer que NS3 pourrait interagir avec d'autres protéines de la voie pour induire l'activation. Cependant, cette hypothétique interaction ne peut avoir lieu qu'avec des protéines présentes en amont des protéines MEK1/2 car l'inhibiteur U0126 bloque totalement l'activation de la voie par NS3. Une de ces protéines pourrait être RasGRP1 car en présence du siARN RasGRP1, nous observons une nette diminution de la phosphorylation des protéines ERK1/2 en surexpression de NS3 laissant

supposer l'implication de cette protéine dans l'activation de la cascade. De plus, du fait de la localisation spécifique de cette protéine à l'appareil de Golgi, il se pourrait que l'activation de la voie MAPK/ERK se produise majoritairement au niveau de ce compartiment cellulaire. Pour étayer cette hypothèse, il serait intéressant de tester des drogues ciblant l'appareil de Golgi ou bloquant le transport des protéines vers l'appareil de Golgi. Parallèlement, pour étudier si BRAF et RasGRP1 agissent de façon synergique ou non dans l'activation de la voie MAPK/ERK par NS3, il serait intéressant d'éteindre simultanément l'expression de ces deux gènes et d'étudier l'activation de la voie en contexte infectieux et en surexpression de NS3.

Il a été décrit qu'un autre membre de la famille des *Reoviridae*, le Rotavirus induit, par l'action de sa protéine VP6, la phosphorylation des protéines ERK1/2 par l'intermédiaire d'un apport de calcium [332]. Or, deux protéines sont décrites au sein de la voie MAPK/ERK pour être sensible au calcium : BRAF et RasGRP1. Une publication sortie en 2016 laisse entrevoir que l'infection par le BTV pourrait entraîner une modulation calcique [309]. Par ailleurs, il a été montré qu'une augmentation de calcium intracellulaire peut induire une dimérisation de BRAF [333]. Il serait donc envisageable que l'activation de la voie MAPK/ERK par le BTV implique l'augmentation de calcium intracellulaire pouvant entraîner soit la dimérisation de BRAF soit la translocation de RasGRP1, nécessaire à l'activation de RAS à l'appareil de Golgi, qui est décrite pour être sensible au calcium et au DAG [257,258]. Ces données nous suggèrent qu'il pourrait y avoir un lien entre l'activation de la voie MAPK/ERK et l'activation de BRAF par l'intermédiaire d'une modulation de calcium intracellulaire.

Comme décrit dans l'introduction page 77, l'activation de BRAF nécessite la libération de son domaine kinase (CR3) qui est à l'état inactif, bloqué par son domaine CR1. Pour lever cette inhibition, il est essentiel qu'une molécule interagisse avec la partie CR1 de BRAF. Dans la littérature, il est décrit que ce phénomène se produit par l'association de BRAF, via son domaine CR1, à la protéine RAS sous sa forme active (RAS-GTP) permettant ainsi de libérer le domaine kinase de BRAF [243]. Dans notre étude, une hypothèse que nous émettons serait que NS3 interagisse avec la partie N-ter de BRAF, permettant ainsi de libérer son domaine kinase nécessaire à son homo- ou hétérodimérisation (BRAF-CRAF). De plus, étant donné que NS3 induit la relocalisation de BRAF au compartiment cellulaire où elle se localise, ceci

permettrait d'accumuler des molécules de BRAF disposant alors leur domaine kinase côte à côte favorisant ainsi leur homodimérisation et donc l'activation de la voie MAPK/ERK. Pour étayer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences complémentaires de co-purification d'affinité visant à évaluer l'éventuelle capacité de NS3 à favoriser l'homo- ou l'hétérodimérisation de BRAF (BRAF-BRAF ou BRAF-CRAF) (Figure 45).

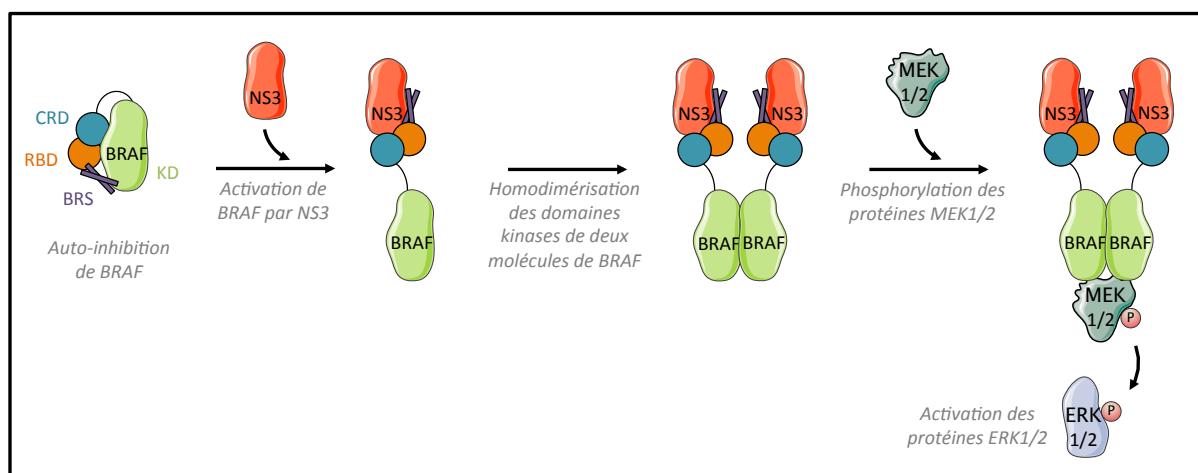


Figure 45 : Représentation schématique hypothétique du mode d'activation de BRAF par NS3 responsable de l'activation de la voie MAPK/ERK.

A l'état basal, le domaine kinase de BRAF (KD) se trouve séquestré par les deux domaines de liaison à RAS (RBD et CRD) et par sa partie BRS qui lui est spécifique. NS3 pourrait possiblement interagir avec ses domaines permettant alors la libération du domaine kinase de BRAF nécessaire à son activation. Étant donné que NS3 relocalise BRAF, elle pourrait possiblement disposer deux molécules de BRAF côte à côte permettant alors l'homodimérisation de leur domaine kinase indispensable à l'activation des protéines MEK1/2.

Une autre possibilité serait que NS3 se lie directement au domaine kinase de BRAF permettant l'activation de la voie. Cependant, cette hypothèse semble moins envisageable au vu des données présentes dans la littérature pour deux raisons : **1)** l'activation du domaine kinase de BRAF nécessite sa dimérisation avec un domaine kinase apparenté, or NS3 n'est pas décrite pour posséder un tel domaine, **2)** pour que le domaine kinase de BRAF soit accessible, BRAF doit subir une première activation permettant la libération de celui-ci.

Comme l'extinction de la protéine RasGRP1 diminue fortement l'activation de la voie par NS3-BTV, il se pourrait que l'activation de la voie MAPK/ERK par l'interaction NS3-BRAF soit dépendante de RasGRP1. Il est possible d'envisager que l'activation passe par un complexe NS3-BRAF-RasGRP1. Il serait donc intéressant de réaliser des tests de co-purification d'affinité afin d'évaluer l'impact de RasGRP1 sur l'interaction NS3-BRAF. Nous avons testé la

possibilité que NS3 puisse également interagir avec RasGRP1 mais il semblerait que cela ne soit pas le cas. Il se pourrait donc que le mécanisme d'activation de la voie soit bien plus complexe.

En outre, l'étude de la localisation de BRAF dans les cellules HeLa et MDBK laisse supposer que l'activation de la voie MAPK/ERK par NS3 se produirait dans des compartiments cellulaires différents en fonction du type cellulaire et dépendrait de la localisation de NS3. En effet, dans les cellules HeLa nous observons une relocalisation de BRAF majoritairement à l'appareil de Golgi où se localise NS3 alors que dans les cellules MDBK la relocalisation de BRAF a lieu principalement à la membrane plasmique où se situe également NS3. Ces résultats suggèrent donc que BRAF se relocalise en fonction de la localisation subcellulaire de NS3 mais indépendamment du compartiment cellulaire. Étant donné que NS3 transite de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique, l'hypothèse qui peut être envisagée serait que l'activation de la voie se produirait dans les deux compartiments cellulaires (membrane plasmique et appareil de Golgi) et que l'activation de la voie à chacun de ces compartiments est possible tant que NS3 est présente. Pour appuyer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des cinétiques d'infection pour observer le mouvement de NS3 de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique en fonction du temps p.i. et d'étudier si BRAF suit la relocalisation de NS3. De plus, des expériences de fractionnement cellulaire pourraient également être réalisées afin d'observer si BRAF suit la localisation de NS3 dans le cytosol.

L'activation de la voie MAPK/ERK par les virus a de multiples conséquences sur la biologie de la cellule hôte. Elle permet notamment d'augmenter la synthèse de cytokines et de chimiokines inflammatoires participant à la mise en place de la réponse immunitaire. De plus, son activation permet de réguler négativement la production d'IFN- α/β permettant ainsi d'altérer la réponse immunitaire innée conférant un avantage considérable à la réplication virale [295]. Nous avons réussi à mettre en évidence qu'il n'existe aucun lien dans la capacité de la protéine NS3 à, d'une part inhiber la réponse IFN- α/β et, d'autre part à potentialiser la voie MAPK/ERK, démontrant ainsi que ce n'est pas l'activation de l'une qui entraîne l'inhibition de l'autre. De ce fait, nous pouvons dire que le BTV a évolué pour développer des stratégies lui permettant de moduler ces deux voies de signalisation indépendamment du lien qu'elles peuvent avoir entre elles. De façon intéressante, des

résultats similaires ont été démontrés pour la protéine C du HPIV-3 qui est capable à la fois d'inhiber le signal des interférons de type I (interaction avec STAT1) et d'activer la voie de signalisation MAPK/ERK (interaction avec GRB2) en utilisant deux stratégies totalement indépendantes [331].

De plus, l'activation de la voie MAPK/ERK peut conduire à une production importante de cytokines pro-inflammatoire pouvant être à l'origine de l'hyper-inflammation des tissus infectés par le BTV. Afin de révéler une telle hyper-inflammation, il serait intéressant de réaliser des expériences *in vivo* consistant à infecter des souris avec le BTV et à les traiter avec l'U0126 pour étudier l'impact de l'inhibiteur sur la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et IL-6). Étant donné que nous observons un impact de l'U0126 sur l'expression de NS3, celui-ci pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique intéressante contre le BTV.



CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis de réaliser le premier interactome complet virus-hôtes (mammifère et vecteur) pour un virus strictement animal et révèle la diversité des interactions protéiques qu'établit le BTV avec ses hôtes. Nous avons ainsi pu identifier 83 nouveaux interacteurs du BTV-8 et du BTV-27. L'identification de ces interacteurs permet de mettre en évidence les voies de signalisation ainsi que les modules fonctionnels ciblés par le BTV. De plus, les cartes générées révèlent toutes les connexions potentielles que le BTV pourrait établir avec ses hôtes pour se répliquer et échapper à la défense de l'hôte. Des expériences de validation biochimiques et fonctionnelles de ces interactions sont en cours pour identifier les conséquences qu'elles peuvent avoir aussi bien sur le virus que sur la cellule. L'analyse des résultats nous révèle un plus grand nombre d'interacteurs pour l'hôte bovin que pour l'hôte vecteur et la validation biochimique de certains d'entre eux révèle que la majorité des interacteurs semblent être partagés entre le BTV-8 et le BTV-27. En effet, les cartes que nous avons construites à partir des données brutes Y2H comporte probablement un nombre significatif d'interactions manquantes (ou faux négatifs) et le nombre d'interacteurs cellulaires partagés entre les deux sérotypes serait par conséquent sous-estimé. L'objectif à présent est donc de comparer ces interactions entre ces deux sérotypes afin d'identifier des interactions cellulaires communes et spécifiques de chacun de ces virus, ce qui suppose de tirer des conclusions aussi bien sur la présence que sur l'absence d'interaction entre une paire de protéines virale et cellulaire donnée.

En parallèle de cette approche de protéomique, nous avons mis en évidence une nouvelle fonction portée par la protéine non structurale NS3 de BTV sur la voie MAPK/ERK qui joue un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires importants au bon fonctionnement de la cellule. En effet, en plus de son rôle antagoniste sur la voie des IFN- α/β , NS3 induit l'activation de la voie MAPK/ERK. Ce phénomène permet probablement au BTV en fonction de son cycle de réplication d'augmenter la survie cellulaire par contrôle du cycle cellulaire. Il pourrait également lui permettre de cibler l'activité de facteurs de traduction à son propre profit. L'ensemble de nos données illustre parfaitement bien, sur le plan moléculaire, le rôle de la protéine NS3 dans la virulence et la pathogénicité associées à l'infection par le BTV. L'identification des interactions que possèdent les protéines virales avec les protéines cellulaires ainsi que les acteurs orchestrant la survie du virus chez l'hôte s'avère essentielle

pour comprendre le cycle de vie du virus et identifier des mécanismes généraux de régulation de l'infection virale. Ces mécanismes, qui pourraient être aussi conservés chez d'autres virus, faciliteraient l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant prévenir certaines interactions qui entraînent une pathogenèse virale.



BIBLIOGRAPHIE

1. Dyer MD, Murali TM, Sobral BW (2008) The landscape of human proteins interacting with viruses and other pathogens. *PLoS Pathog* 4: e32.
2. de Chassey B, Meyniel-Schicklin L, Vonderscher J, Andre P, Lotteau V (2014) Virus-host interactomics: new insights and opportunities for antiviral drug discovery. *Genome Med* 6: 115.
3. Cassonnet P, Rolloy C, Neveu G, Vidalain PO, Chantier T, et al. (2011) Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nat Methods* 8: 990-992.
4. Uzoma I, Zhu H (2013) Interactome mapping: using protein microarray technology to reconstruct diverse protein networks. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 11: 18-28.
5. Hutcheon D (1092) Malarial catarrhal fever of sheep. *Veterinary Record* 14: 629-633.
6. Spreull J (1905) Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 18: 321-337.
7. Theiler A (1908) Inoculation of sheep against bluetongue and results in practise. *Veterinary Journal* 64: 600-607.
8. Balenghien T, Belbis G, Berkvens D, Boireau P, Calavas D, et al. (2009) La fièvre catarrhale ovine: Guides France Agricole. 1-185 p.
9. Maclachlan NJ (2011) Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. *Prev Vet Med* 102: 107-111.
10. Wilson AJ, Mellor PS (2009) Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 2669-2681.
11. Hardy WT, Price DA (1952) Soremuzzle of sheep. *J Am Vet Med Assoc* 120: 23-25.
12. Sapre S (1964) An outbreak of bluetongue in goats and sheep. *Veterinary Review* 15: 78-80.
13. St George TD, Standfast HA, Cybinski DH, Dyce AL, Muller MJ, et al. (1978) The isolation of a bluetongue virus from *Culicoides* collected in the Northern Territory of Australia. *Aust Vet J* 54: 153-154.
14. Roy P (2007) *Fields Virology*. 1402-1423 p.
15. Wilson A, Mellor P (2008) Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitol Res* 103 Suppl 1: S69-77.
16. Tabachnick WJ (2004) *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet Ital* 40: 144-150.
17. Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS (2008) Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg Infect Dis* 14: 539-544.
18. Mellor PS, Wittmann EJ (2002) Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet J* 164: 20-37.
19. Mellor PS, Carpenter S, Harrup L, Baylis M, Mertens PP (2008) Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: history of occurrence prior to 2006. *Prev Vet Med* 87: 4-20.
20. Albina E, Zientara S, Sailleau C, Perrin A, Cêtre-Sossah C, et al. (2007) La fièvre catarrhale ovine (bluetongue) : quand une maladie du sud s'invite au nord. *Virologie* 11: 63-74.
21. Sailleau C, Breard E, Gerbier G, Parodi J, Bouchot A, et al. (2004) Epidémiologie descriptive et moléculaire de la bluetongue en Corse en 2004. *Epidémiologie et santé animale* 48: 9-14.
22. Backx A, Heutink CG, van Rooij EM, van Rijn PA (2007) Clinical signs of bluetongue virus serotype 8 infection in sheep and goats. *Vet Rec* 161: 591-592.

23. Darpel KE, Batten CA, Veronesi E, Shaw AE, Anthony S, et al. (2007) Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Vet Rec* 161: 253-261.
24. Elbers AR, Backx A, Meroc E, Gerbier G, Staubach C, et al. (2008) Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev Vet Med* 87: 21-30.
25. Elbers AR, Backx A, Mintiens K, Gerbier G, Staubach C, et al. (2008) Field observations during the Bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. *Prev Vet Med* 87: 31-40.
26. Linden A, Gregoire F, Nahayo A, Hanrez D, Mousset B, et al. (2010) Bluetongue virus in wild deer, Belgium, 2005-2008. *Emerg Infect Dis* 16: 833-836.
27. Darpel KE, Batten CA, Veronesi E, Williamson S, Anderson P, et al. (2009) Transplacental transmission of bluetongue virus 8 in cattle, UK. *Emerg Infect Dis* 15: 2025-2028.
28. De Clercq K, Vandenbussche F, Vandemeulebroucke E, Vanbinst T, De Leeuw I, et al. (2008) Transplacental bluetongue infection in cattle. *Vet Rec* 162: 564.
29. Meiswinkel R, Baldet T, de Deken R, Takken W, Delecolle JC, et al. (2008) The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe--the entomological perspective. *Prev Vet Med* 87: 55-63.
30. Mintiens K, Meroc E, Mellor PS, Staubach C, Gerbier G, et al. (2008) Possible routes of introduction of bluetongue virus serotype 8 into the epicentre of the 2006 epidemic in north-western Europe. *Prev Vet Med* 87: 131-144.
31. Angot JL, Berkvens D, Bexiga R, Brückner G, Cassart D, et al. (2009) Fièvre catarrhale ovine en Europe du Nord: L'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE).
32. Maan S, Maan NS, Ross-smith N, Batten CA, Shaw AE, et al. (2008) Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. *Virology* 377: 308-318.
33. Katsoulos PD, Giadinis ND, Chaintoutis SC, Dovas CI, Kiossis E, et al. (2016) Epidemiological characteristics and clinicopathological features of bluetongue in sheep and cattle, during the 2014 BTV serotype 4 incursion in Greece. *Trop Anim Health Prod* 48: 469-477.
34. Hornyak A, Malik P, Marton S, Doro R, Cadar D, et al. (2015) Emergence of multireassortant bluetongue virus serotype 4 in Hungary. *Infect Genet Evol* 33: 6-10.
35. Sailleau C, Breard E, Viarouge C, Gorlier A, Quenault H, et al. (2018) Complete genome sequence of bluetongue virus serotype 4 that emerged on the French island of Corsica in December 2016. *Transbound Emerg Dis* 65: e194-e197.
36. Calavas D, Breard E, Sailleau C, Zientara S, Cauchard J, et al. (2017) Un cas de FCO-4 chez un veau en Haute-Savoie. *Plateforme ESA*: 1-2.
37. Sailleau C, Breard E, Viarouge C, Vitour D, Romey A, et al. (2017) Re-Emergence of Bluetongue Virus Serotype 8 in France, 2015. *Transbound Emerg Dis* 64: 998-1000.
38. Courtejoie N, Durand B, Bournez L, Gorlier A, Breard E, et al. (2018) Circulation of bluetongue virus 8 in French cattle, before and after the re-emergence in 2015. *Transbound Emerg Dis* 65: 281-284.
39. Bournez L, Sailleau C, Breard E, Zientara S, Zanella G, et al. (2016) Ré-émergence de la fièvre catarrhale ovine BTV-8 en France : bilan de la situation épidémiologique entre septembre et décembre 2015. *Bulletin épidémiologique*: 1-11.

40. Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, Chaignat V, Worwa G, et al. (2008) Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 14: 1855-1861.
41. Chaignat V, Worwa G, Scherrer N, Hilbe M, Ehrensperger F, et al. (2009) Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. *Vet Microbiol* 138: 11-19.
42. Batten CA, Henstock MR, Bin-Tarif A, Steedman HM, Waddington S, et al. (2012) Bluetongue virus serotype 26: infection kinetics and pathogenesis in Dorset Poll sheep. *Vet Microbiol* 157: 119-124.
43. Maan S, Maan NS, Nomikou K, Veronesi E, Bachanek-Bankowska K, et al. (2011) Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait. *PLoS One* 6: e26147.
44. Batten C, Darpel K, Henstock M, Fay P, Veronesi E, et al. (2014) Evidence for transmission of bluetongue virus serotype 26 through direct contact. *PLoS One* 9: e96049.
45. Zientara S, Sailleau C, Viarouge C, Hoper D, Beer M, et al. (2014) Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg Infect Dis* 20: 2123-2125.
46. Schulz C, Breard E, Sailleau C, Jenckel M, Viarouge C, et al. (2016) Bluetongue virus serotype 27: detection and characterization of two novel variants in Corsica, France. *J Gen Virol* 97: 2073-2083.
47. Breard E, Schulz C, Sailleau C, Bernelin-Cottet C, Viarouge C, et al. (2018) Bluetongue virus serotype 27: Experimental infection of goats, sheep and cattle with three BT-27 variants reveal atypical characteristics and likely direct contact transmission BT-27 between goats. *Transbound Emerg Dis* 65: e251-e263.
48. Bumbarov V, Golender N, Erster O, Khinich Y (2016) Detection and isolation of Bluetongue virus from commercial vaccine batches. *Vaccine* 34: 3317-3323.
49. Wright IM (2014) Serological and genetic characterisation of putative new serotypes of bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease virus isolated from an alpaca: University of North-West.
50. Savini G, Puggioni G, Meloni G, Marcacci M, Di Domenico M, et al. (2017) Novel putative Bluetongue virus in healthy goats from Sardinia, Italy. *Infect Genet Evol* 51: 108-117.
51. Sun EC, Huang LP, Xu QY, Wang HX, Xue XM, et al. (2016) Emergence of a Novel Bluetongue Virus Serotype, China 2014. *Transbound Emerg Dis* 63: 585-589.
52. Meiswinkel R (1989) Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 56: 23-39.
53. Mellor PS (1990) The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 162: 143-161.
54. Wilson A, Darpel K, Mellor PS (2008) Where does bluetongue virus sleep in the winter? *PLoS Biol* 6: e210.
55. Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000) *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 45: 307-340.
56. Mullens BA, Tabachnick WJ, Holbrook FR, Thompson LH (1995) Effects of temperature on virogenesis of bluetongue virus serotype 11 in *Culicoides variipennis sonorensis*. *Med Vet Entomol* 9: 71-76.
57. Wittmann EJ, Mello PS, Baylis M (2002) Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Med Vet Entomol* 16: 147-156.

58. O'Connell L (2002) Entomological aspects of orbiviruses by Culicoides biting midges: University of Bristol.
59. Carpenter S, Wilson A, Barber J, Veronesi E, Mellor P, et al. (2011) Temperature dependence of the extrinsic incubation period of orbiviruses in Culicoides biting midges. *PLoS One* 6: e27987.
60. Magliano A, Scaramozzino P, Ravagnan S, Montarsi F, G DAR, et al. (2018) Indoor and outdoor winter activity of Culicoides biting midges, vectors of bluetongue virus, in Italy. *Med Vet Entomol* 32: 70-77.
61. Barratt-Boyes SM, MacLachlan NJ (1995) Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle. *J Am Vet Med Assoc* 206: 1322-1329.
62. Hemati B, Contreras V, Urien C, Bonneau M, Takamatsu HH, et al. (2009) Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *J Virol* 83: 8789-8799.
63. Barratt-Boyes SM, MacLachlan NJ (1994) Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Vet Microbiol* 40: 361-371.
64. MacLachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, Worwa G (2009) The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J Comp Pathol* 141: 1-16.
65. MacLachlan NJ, Osburn BI (2008) Induced brain lesions in calves infected with bluetongue virus. *Vet Rec* 162: 490-491.
66. MacLachlan NJ (1994) The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 17: 197-206.
67. MacLachlan NJ (2004) Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Vet Ital* 40: 462-467.
68. Gowen BB, Holbrook MR (2008) Animal models of highly pathogenic RNA viral infections: hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Res* 78: 79-90.
69. DeMaula CD, Jutila MA, Wilson DW, MacLachlan NJ (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.
70. DeMaula CD, Leutenegger CM, Bonneau KR, MacLachlan NJ (2002) The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology* 296: 330-337.
71. DeMaula CD, Leutenegger CM, Jutila MA, MacLachlan NJ (2002) Bluetongue virus-induced activation of primary bovine lung microvascular endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 86: 147-157.
72. MacLachlan NJ, Crafford JE, Vernau W, Gardner IA, Goddard A, et al. (2008) Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. *Vet Pathol* 45: 310-315.
73. Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, et al. (2008) Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res* 39: 46.
74. Maan S, Maan NS, Nomikou K, Batten C, Antony F, et al. (2011) Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerg Infect Dis* 17: 886-889.
75. Gould AR, Eaton BT (1990) The amino acid sequence of the outer coat protein VP2 of neutralizing monoclonal antibody-resistant, virulent and attenuated bluetongue viruses. *Virus Res* 17: 161-172.
76. Roy P, Marshall JJ, French TJ (1990) Structure of the bluetongue virus genome and its encoded proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 162: 43-87.
77. Roy P (2005) Bluetongue virus proteins and particles and their role in virus entry, assembly, and release. *Adv Virus Res* 64: 69-123.

78. Belhouchet M, Mohd Jaafar F, Firth AE, Grimes JM, Mertens PP, et al. (2011) Detection of a fourth orbivirus non-structural protein. *PLoS One* 6: e25697.
79. Stewart M, Hardy A, Barry G, Pinto RM, Caporale M, et al. (2015) Characterization of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus. *J Gen Virol* 96: 3280-3293.
80. Fukusho A, Yu Y, Yamaguchi S, Roy P (1989) Completion of the sequence of bluetongue virus serotype 10 by the characterization of a structural protein, VP6, and a non-structural protein, NS2. *J Gen Virol* 70 (Pt 7): 1677-1689.
81. Mertens PP, Sangar DV (1985) Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses. *Virology* 140: 55-67.
82. Mertens PP, Brown F, Sangar DV (1984) Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology* 135: 207-217.
83. Ratnien M, Caporale M, Golder M, Franzoni G, Allan K, et al. (2011) Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS Pathog* 7: e1002477.
84. Grimes JM, Burroughs JN, Gouet P, Diprose JM, Malby R, et al. (1998) The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature* 395: 470-478.
85. Gouet P, Diprose JM, Grimes JM, Malby R, Burroughs JN, et al. (1999) The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell* 97: 481-490.
86. Diprose JM, Burroughs JN, Sutton GC, Goldsmith A, Gouet P, et al. (2001) Translocation portals for the substrates and products of a viral transcription complex: the bluetongue virus core. *EMBO J* 20: 7229-7239.
87. Urbano P, Urbano FG (1994) The Reoviridae family. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 17: 151-161.
88. Verwoerd DW, Els HJ, De Villiers EM, Huismans H (1972) Structure of the bluetongue virus capsid. *J Virol* 10: 783-794.
89. Roy P (2008) Bluetongue virus: dissection of the polymerase complex. *J Gen Virol* 89: 1789-1804.
90. Nason EL, Rothagel R, Mukherjee SK, Kar AK, Forzan M, et al. (2004) Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. *J Virol* 78: 8059-8067.
91. Eaton BT, Crameri GS (1989) The site of bluetongue virus attachment to glycoporphins from a number of animal erythrocytes. *J Gen Virol* 70 (Pt 12): 3347-3353.
92. Patel A, Roy P (2014) The molecular biology of Bluetongue virus replication. *Virus Res* 182: 5-20.
93. Hassan SH, Wirblich C, Forzan M, Roy P (2001) Expression and functional characterization of bluetongue virus VP5 protein: role in cellular permeabilization. *J Virol* 75: 8356-8367.
94. Roy P (2008) Functional mapping of bluetongue virus proteins and their interactions with host proteins during virus replication. *Cell Biochem Biophys* 50: 143-157.
95. Verwoerd DW, Huismans H (1972) Studies on the in vitro and the in vivo transcription of the bluetongue virus genome. *Onderstepoort J Vet Res* 39: 185-191.
96. Lourenco S, Roy P (2011) In vitro reconstitution of Bluetongue virus infectious cores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13746-13751.
97. Mertens PP, Diprose J (2004) The bluetongue virus core: a nano-scale transcription machine. *Virus Res* 101: 29-43.

98. Stauber N, Martinez-Costas J, Sutton G, Monastyrskaya K, Roy P (1997) Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyze the unwinding of double-stranded RNA substrates. *J Virol* 71: 7220-7226.
99. Roy P, Adachi A, Urakawa T, Booth TF, Thomas CP (1990) Identification of bluetongue virus VP6 protein as a nucleic acid-binding protein and the localization of VP6 in virus-infected vertebrate cells. *J Virol* 64: 1-8.
100. Kar AK, Roy P (2003) Defining the structure-function relationships of bluetongue virus helicase protein VP6. *J Virol* 77: 11347-11356.
101. Boyce M, Wehrfritz J, Noad R, Roy P (2004) Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity. *J Virol* 78: 3994-4002.
102. Urakawa T, Ritter DG, Roy P (1989) Expression of largest RNA segment and synthesis of VP1 protein of bluetongue virus in insect cells by recombinant baculovirus: association of VP1 protein with RNA polymerase activity. *Nucleic Acids Res* 17: 7395-7401.
103. Roy P, Fukusho A, Ritter GD, Lyon D (1988) Evidence for genetic relationship between RNA and DNA viruses from the sequence homology of a putative polymerase gene of bluetongue virus with that of vaccinia virus: conservation of RNA polymerase genes from diverse species. *Nucleic Acids Res* 16: 11759-11767.
104. Wehrfritz JM, Boyce M, Mirza S, Roy P (2007) Reconstitution of bluetongue virus polymerase activity from isolated domains based on a three-dimensional structural model. *Biopolymers* 86: 83-94.
105. Matsuo E, Roy P (2011) Bluetongue virus VP1 polymerase activity in vitro: template dependency, dinucleotide priming and cap dependency. *PLoS One* 6: e27702.
106. Van Dijk AA, Huismans H (1980) The in vitro activation and further characterization of the bluetongue virus-associated transcriptase. *Virology* 104: 347-356.
107. Van Dijk AA, Huismans H (1988) In vitro transcription and translation of bluetongue virus mRNA. *J Gen Virol* 69 (Pt 3): 573-581.
108. Martinez-Costas J, Sutton G, Ramadevi N, Roy P (1998) Guanylyltransferase and RNA 5'-triphosphatase activities of the purified expressed VP4 protein of bluetongue virus. *J Mol Biol* 280: 859-866.
109. Ramadevi N, Burroughs NJ, Mertens PP, Jones IM, Roy P (1998) Capping and methylation of mRNA by purified recombinant VP4 protein of bluetongue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13537-13542.
110. Mertens PP, Burroughs JN, Anderson J (1987) Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology* 157: 375-386.
111. Roy P (1989) Bluetongue virus genetics and genome structure. *Virus Res* 13: 179-206.
112. Boyce M, Celma CC, Roy P (2012) Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis. *Virol J* 9: 178.
113. Eaton BT, Hyatt AD, White JR (1988) Localization of the nonstructural protein NS1 in bluetongue virus-infected cells and its presence in virus particles. *Virology* 163: 527-537.
114. Urakawa T, Roy P (1988) Bluetongue virus tubules made in insect cells by recombinant baculoviruses: expression of the NS1 gene of bluetongue virus serotype 10. *J Virol* 62: 3919-3927.

115. Hewat EA, Booth TF, Wade RH, Roy P (1992) 3-D reconstruction of bluetongue virus tubules using cryoelectron microscopy. *J Struct Biol* 108: 35-48.
116. Owens RJ, Limn C, Roy P (2004) Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular pathogenesis and virus release. *J Virol* 78: 6649-6656.
117. Thomas CP, Booth TF, Roy P (1990) Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *J Gen Virol* 71 (Pt 9): 2073-2083.
118. Brookes SM, Hyatt AD, Eaton BT (1993) Characterization of virus inclusion bodies in bluetongue virus-infected cells. *J Gen Virol* 74 (Pt 3): 525-530.
119. Eaton BT, Hyatt AD, White JR (1987) Association of bluetongue virus with the cytoskeleton. *Virology* 157: 107-116.
120. Eaton BT, Hyatt AD, Brookes SM (1990) The replication of bluetongue virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 162: 89-118.
121. Kar AK, Bhattacharya B, Roy P (2007) Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Mol Biol* 8: 4.
122. Modrof J, Lympieropoulos K, Roy P (2005) Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies. *J Virol* 79: 10023-10031.
123. Horscroft NJ, Roy P (2000) NTP binding and phosphohydrolase activity associated with purified bluetongue virus non-structural protein NS2. *J Gen Virol* 81: 1961-1965.
124. Firth AE (2008) Bioinformatic analysis suggests that the Orbivirus VP6 cistron encodes an overlapping gene. *Virol J* 5: 48.
125. Ratnien M, Shaw AE, Barry G, Gu Q, Di Gialleonardo L, et al. (2016) Bluetongue Virus NS4 Protein Is an Interferon Antagonist and a Determinant of Virus Virulence. *J Virol* 90: 5427-5439.
126. Cheung W, Gill M, Esposito A, Kaminski CF, Courousse N, et al. (2010) Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J Virol* 84: 6782-6798.
127. Breese SS, Jr., Ozawa Y (1969) Intracellular inclusions resulting from infection with African horsesickness virus. *J Virol* 4: 109-112.
128. Hassan SS, Roy P (1999) Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *J Virol* 73: 9832-9842.
129. Forzan M, Marsh M, Roy P (2007) Bluetongue virus entry into cells. *J Virol* 81: 4819-4827.
130. Huismans H, van Dijk AA, Bauskin AR (1987) In vitro phosphorylation and purification of a nonstructural protein of bluetongue virus with affinity for single-stranded RNA. *J Virol* 61: 3589-3595.
131. Forzan M, Wirblich C, Roy P (2004) A capsid protein of nonenveloped Bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2100-2105.
132. Zhang X, Boyce M, Bhattacharya B, Zhang X, Schein S, et al. (2010) Bluetongue virus coat protein VP2 contains sialic acid-binding domains, and VP5 resembles enveloped virus fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 6292-6297.
133. Sutton G, Grimes JM, Stuart DI, Roy P (2007) Bluetongue virus VP4 is an RNA-capping assembly line. *Nat Struct Mol Biol* 14: 449-451.

134. Butan C, Van Der Zandt H, Tucker PA (2004) Structure and assembly of the RNA binding domain of bluetongue virus non-structural protein 2. *J Biol Chem* 279: 37613-37621.
135. Fillmore GC, Lin H, Li JK (2002) Localization of the single-stranded RNA-binding domains of bluetongue virus nonstructural protein NS2. *J Virol* 76: 499-506.
136. Kar AK, Ghosh M, Roy P (2004) Mapping the assembly pathway of Bluetongue virus scaffolding protein VP3. *Virology* 324: 387-399.
137. Loudon PT, Roy P (1991) Assembly of five bluetongue virus proteins expressed by recombinant baculoviruses: inclusion of the largest protein VP1 in the core and virus-like proteins. *Virology* 180: 798-802.
138. Ramadevi N, Rodriguez J, Roy P (1998) A leucine zipper-like domain is essential for dimerization and encapsidation of bluetongue virus nucleocapsid protein VP4. *J Virol* 72: 2983-2990.
139. Celma CC, Roy P (2009) A viral nonstructural protein regulates bluetongue virus trafficking and release. *J Virol* 83: 6806-6816.
140. Bhattacharya B, Roy P (2008) Bluetongue virus outer capsid protein VP5 interacts with membrane lipid rafts via a SNARE domain. *J Virol* 82: 10600-10612.
141. Beaton AR, Rodriguez J, Reddy YK, 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.
142. Hyatt AD, Gould AR, Coupar B, Eaton BT (1991) Localization of the non-structural protein NS3 in bluetongue virus-infected cells. *J Gen Virol* 72 (Pt 9): 2263-2267.
143. Xu G, Wilson W, Mecham J, Murphy K, Zhou EM, et al. (1997) VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in *Culicoides variipennis*. *J Gen Virol* 78 (Pt 7): 1617-1623.
144. Tan BH, Nason E, Staeuber N, Jiang W, Monastyrskaya K, et al. (2001) RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells. *J Virol* 75: 3937-3947.
145. Shaw AE, Veronesi E, Maurin G, Ftaich N, Guiguen F, et al. (2012) *Drosophila melanogaster* as a model organism for bluetongue virus replication and tropism. *J Virol* 86: 9015-9024.
146. Celma CC, 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.
147. Huismans H (1969) Bluetongue virus-induced interferon synthesis. *Onderstepoort J Vet Res* 36: 181-185.
148. Lyons SF, Schoub BD, Chiu MN, Crespi M (1982) Induction of interferon by Sendai virus versus blue tongue virus. *J Interferon Res* 2: 543-547.
149. Fulton RW, Pearson NJ (1982) Interferon induction in bovine and feline monolayer cultures by four bluetongue virus serotypes. *Can J Comp Med* 46: 100-102.
150. Chauveau E, Doceul V, Lara E, Adam M, Breard E, et al. (2012) Sensing and control of bluetongue virus infection in epithelial cells via RIG-I and MDA5 helicases. *J Virol* 86: 11789-11799.
151. Foster NM, Luedke AJ, Parsonson IM, Walton TE (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.
152. Ruscanu S, Pascale F, Bourge M, Hemati B, Elhmouzi-Younes J, 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.
153. Ruscanu S, Jouneau L, Urien C, Bourge M, Lecardonnel J, et al. (2013) Dendritic cell subtypes from lymph nodes and blood show contrasted gene expression programs upon Bluetongue virus infection. *J Virol* 87: 9333-9343.
 154. Chauveau E, Doceul V, Lara E, Breard E, Sailleau C, et al. (2013) NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *J Virol* 87: 8241-8246.
 155. Doceul V, Chauveau E, Lara E, Breard E, Sailleau C, et al. (2014) Dual modulation of type I interferon response by bluetongue virus. *J Virol* 88: 10792-10802.
 156. Lobato ZI, Coupard BE, Gray CP, Lunt R, Andrew ME (1997) Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 293-309.
 157. Roy P, Urakawa T, Van Dijk AA, Erasmus BJ (1990) Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *J Virol* 64: 1998-2003.
 158. DeMaula CD, Heidner HW, Rossitto PV, Pierce CM, MacLachlan NJ (1993) Neutralization determinants of United States bluetongue virus serotype ten. *Virology* 195: 292-296.
 159. Jeggo MH, Wardley RC, Taylor WP (1984) Role of neutralising antibody in passive immunity to bluetongue infection. *Res Vet Sci* 36: 81-86.
 160. Huismans H, Erasmus BJ (1981) Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J Vet Res* 48: 51-58.
 161. Mertens PP, Pedley S, Cowley J, Burroughs JN, Corteyn AH, et al. (1989) Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology* 170: 561-565.
 162. Jeggo MH, Gumm ID, Taylor WP (1983) Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types. *Res Vet Sci* 34: 205-211.
 163. Umeshappa CS, Singh KP, Pandey AB, Singh RP, Nanjundappa RH (2010) Cell-mediated immune response and cross-protective efficacy of binary ethylenimine-inactivated bluetongue virus serotype-1 vaccine in sheep. *Vaccine* 28: 2522-2531.
 164. DeMaula CD, Bonneau KR, MacLachlan NJ (2000) Changes in the outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies. *Virus Res* 67: 59-66.
 165. Wilson WC, Bernard KA, Israel BA, Mecham JO (2008) Bluetongue virus serotype 17 sequence variation associated with neutralization. *DNA Seq* 19: 237-240.
 166. Roy P, French T, Erasmus BJ (1992) Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. *Vaccine* 10: 28-32.
 167. Roy P, Bishop DH, LeBlois H, Erasmus BJ (1994) Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine* 12: 805-811.
 168. Cowley JA, Gorman BM (1989) Cross-neutralization of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21. *Vet Microbiol* 19: 37-51.
 169. Barratt-Boyes SM, Rossitto PV, Taylor BC, Ellis JA, MacLachlan NJ (1995) Response of the regional lymph node to bluetongue virus infection in calves. *Vet Immunol Immunopathol* 45: 73-84.
 170. Ellis JA, Luedke AJ, Davis WC, Wechsler SJ, Mecham JO, et al. (1990) T lymphocyte subset alterations following bluetongue virus infection in sheep and cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 24: 49-67.

171. Andrew M, Whiteley P, Janardhana V, Lobato Z, Gould A, et al. (1995) Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *Vet Immunol Immunopathol* 47: 311-322.
172. Savini G, MacLachlan NJ, Sanchez-Vizcaino JM, Zientara S (2008) Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31: 101-120.
173. Veronesi E, Hamblin C, Mellor PS (2005) Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Vaccine* 23: 5509-5516.
174. Stewart M, Bhatia Y, Athmaran TN, Noad R, Gastaldi C, et al. (2010) Validation of a novel approach for the rapid production of immunogenic virus-like particles for bluetongue virus. *Vaccine* 28: 3047-3054.
175. Stewart M, Dovas CI, Chatzinasiou E, Athmaram TN, Papanastassopoulou M, et al. (2012) Protective efficacy of Bluetongue virus-like and subvirus-like particles in sheep: presence of the serotype-specific VP2, independent of its geographic lineage, is essential for protection. *Vaccine* 30: 2131-2139.
176. Calvo-Pinilla E, Castillo-Olivares J, Jabbar T, Ortego J, de la Poza F, et al. (2014) Recombinant vaccines against bluetongue virus. *Virus Res* 182: 78-86.
177. van Rijn PA, Daus FJ, Maris-Veldhuis MA, Feenstra F, van Gennip RGP (2017) Bluetongue Disabled Infectious Single Animal (DISA) vaccine: Studies on the optimal route and dose in sheep. *Vaccine* 35: 231-237.
178. French TJ, Inumaru S, Roy P (1989) Expression of two related nonstructural proteins of bluetongue virus (BTV) type 10 in insect cells by a recombinant baculovirus: production of polyclonal ascitic fluid and characterization of the gene product in BTV-infected BHK cells. *J Virol* 63: 3270-3278.
179. Lee JW, Roy P (1986) Nucleotide sequence of a cDNA clone of RNA segment 10 of bluetongue virus (serotype 10). *J Gen Virol* 67 (Pt 12): 2833-2837.
180. Guirakhoo F, Catalan JA, Monath TP (1995) Adaptation of bluetongue virus in mosquito cells results in overexpression of NS3 proteins and release of virus particles. *Arch Virol* 140: 967-974.
181. Wu X, Chen SY, Iwata H, Compans RW, Roy P (1992) Multiple glycoproteins synthesized by the smallest RNA segment (S10) of bluetongue virus. *J Virol* 66: 7104-7112.
182. Han Z, Harty RN (2004) The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J Biol Chem* 279: 43092-43097.
183. Bansal OB, Stokes A, Bansal A, Bishop D, Roy P (1998) Membrane organization of bluetongue virus nonstructural glycoprotein NS3. *J Virol* 72: 3362-3369.
184. van Gennip RG, van de Water SG, van Rijn PA (2014) Bluetongue virus nonstructural protein NS3/NS3a is not essential for virus replication. *PLoS One* 9: e85788.
185. Wirblich C, Bhattacharya B, Roy P (2006) Nonstructural protein 3 of bluetongue virus assists virus release by recruiting ESCRT-I protein Tsg101. *J Virol* 80: 460-473.
186. van Staden V, Stoltz MA, Huismans H (1995) Expression of nonstructural protein NS3 of African horsesickness virus (AHSV): evidence for a cytotoxic effect of NS3 in insect cells, and characterization of the gene products in AHSV infected Vero cells. *Arch Virol* 140: 289-306.
187. Rescher U, Gerke V (2008) S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Arch* 455: 575-582.

188. Sarafian T, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF (1991) The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* 114: 1135-1147.
189. Nakata T, Sobue K, Hirokawa N (1990) Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 110: 13-25.
190. Gerke V (1990) Tyrosine kinase substrate annexin II (p36)--biochemical characterization and conservation among species. *Biochem Soc Trans* 18: 1106-1108.
191. Johnsson N, Gerke V, Weber K (1990) P36, member of the CA2+/lipid binding proteins (annexins, calpactins, lipocortins) and its complex with P11; molecular aspects. *Prog Clin Biol Res* 349: 123-133.
192. Bhattacharya B, Noad RJ, Roy P (2007) Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virol J* 4: 7.
193. Strack B, Calistri A, Accola MA, Palu G, Gottlinger HG (2000) A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13063-13068.
194. Janowicz A, Caporale M, Shaw A, Gulletta S, Di Gialleonardo L, et al. (2015) Multiple genome segments determine virulence of bluetongue virus serotype 8. *J Virol* 89: 5238-5249.
195. Celma CC, Bhattacharya B, Eschbaumer M, Wernike K, Beer M, et al. (2014) Pathogenicity study in sheep using reverse-genetics-based reassortant bluetongue viruses. *Vet Microbiol* 174: 139-147.
196. Ftaich N, Ciancia C, Viarouge C, Barry G, Ratinier M, et al. (2015) Turnover Rate of NS3 Proteins Modulates Bluetongue Virus Replication Kinetics in a Host-Specific Manner. *J Virol* 89: 10467-10481.
197. Pourcelot M, Zemirli N, Silva Da Costa L, Loyant R, Garcin D, et al. (2016) The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing. *BMC Biol* 14: 69.
198. Krishna M, Narang H (2008) The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* 65: 3525-3544.
199. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373-384.
200. Ichijo H (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18: 6087-6093.
201. Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1358-1375.
202. Remy G, Risco AM, Inesta-Vaquera FA, Gonzalez-Teran B, Sabio G, et al. (2010) Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cell Signal* 22: 660-667.
203. Zhang W, Liu HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12: 9-18.
204. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, et al. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270: 7420-7426.
205. Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429: 403-417.

206. Chen F (2012) JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer Res* 72: 379-386.
207. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26: 3279-3290.
208. Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 396-405.
209. Bubici C, Papa S (2014) JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 171: 24-37.
210. Bogoyevitch MA, Kobe B (2006) Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 1061-1095.
211. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143-180.
212. Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J, Berk BC (2001) Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* 276: 10870-10878.
213. English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH (1995) Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 270: 28897-28902.
214. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270: 12665-12669.
215. Mulloy R, Salinas S, Philips A, Hipkind RA (2003) Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* 22: 5387-5398.
216. Ranganathan A, Pearson GW, Chrestensen CA, Sturgill TW, Cobb MH (2006) The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK. *Arch Biochem Biophys* 449: 8-16.
217. Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 50-83.
218. Klinger S, Turgeon B, Levesque K, Wood GA, Aagaard-Tillery KM, et al. (2009) Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16710-16715.
219. Abe MK, Kahle KT, Saelzler MP, Orth K, Dixon JE, et al. (2001) ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* 276: 21272-21279.
220. Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR (1999) Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* 19: 1301-1312.
221. Klevernic IV, Stafford MJ, Morrice N, Pegg M, Morton S, et al. (2006) Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *Biochem J* 394: 365-373.
222. Henrich LM, Smith JA, Kitt D, Errington TM, Nguyen B, et al. (2003) Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Mol Cell Biol* 23: 5979-5988.
223. Saelzler MP, Spackman CC, Liu Y, Martinez LC, Harris JP, et al. (2006) ERK8 down-regulates transactivation of the glucocorticoid receptor through Hic-5. *J Biol Chem* 281: 16821-16832.
224. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, et al. (1999) The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* 399: 798-802.

225. Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S, Zhao H, et al. (2005) STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4524-4529.
226. Smit L, Baas A, Kuipers J, Korswagen H, van de Wetering M, et al. (2004) Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway. *J Biol Chem* 279: 17232-17240.
227. Boulton TG, Cobb MH (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 2: 357-371.
228. Fehrenbacher N, Bar-Sagi D, Philips M (2009) Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol Oncol* 3: 297-307.
229. Mor A, Philips MR (2006) Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* 24: 771-800.
230. Carpenter G, Zendejui JG (1986) Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. *Exp Cell Res* 164: 1-10.
231. Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-225.
232. Buday L, Downward J (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73: 611-620.
233. Karnoub AE, Weinberg RA (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 517-531.
234. Bonner T, O'Brien SJ, Nash WG, Rapp UR, Morton CC, et al. (1984) The human homologs of the raf (mil) oncogene are located on human chromosomes 3 and 4. *Science* 223: 71-74.
235. Ishikawa F, Takaku F, Ochiai M, Hayashi K, Hirohashi S, et al. (1985) Activated c-raf gene in a rat hepatocellular carcinoma induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Biochem Biophys Res Commun* 132: 186-192.
236. Kozak C, Gunnell MA, Rapp UR (1984) A new oncogene, c-raf, is located on mouse chromosome 6. *J Virol* 49: 297-299.
237. Bonner TI, Kerby SB, Suttrave P, Gunnell MA, Mark G, et al. (1985) Structure and biological activity of human homologs of the raf/mil oncogene. *Mol Cell Biol* 5: 1400-1407.
238. Huebner K, ar-Rushdi A, Griffin CA, Isobe M, Kozak C, et al. (1986) Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromosome in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3934-3938.
239. Huleihel M, Goldsborough M, Cleveland J, Gunnell M, Bonner T, et al. (1986) Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene. *Mol Cell Biol* 6: 2655-2662.
240. Mark GE, Seeley TW, Shows TB, Mountz JD (1986) Pks, a raf-related sequence in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6312-6316.
241. Ishikawa F, Takaku F, Nagao M, Sugimura T (1987) The complete primary structure of the rat A-raf cDNA coding region: conservation of the putative regulatory regions present in rat c-raf. *Oncogene Res* 1: 243-253.
242. Ikawa S, Fukui M, Ueyama Y, Tamaoki N, Yamamoto T, et al. (1988) B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol Cell Biol* 8: 2651-2654.
243. Lavoie H, Therrien M (2015) Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 281-298.

244. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, et al. (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1263-1284.
245. Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E (1997) Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J* 16: 1901-1908.
246. Fukuda M, Gotoh I, Gotoh Y, Nishida E (1996) Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* 271: 20024-20028.
247. Catling AD, Schaeffer HJ, Reuter CW, Reddy GR, Weber MJ (1995) A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol Cell Biol* 15: 5214-5225.
248. Therrien M, Chang HC, Solomon NM, Karim FD, Wassarman DA, et al. (1995) KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell* 83: 879-888.
249. Sundaram M, Han M (1995) The *C. elegans* *ksr-1* gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell* 83: 889-901.
250. Kornfeld K, Hom DB, Horvitz HR (1995) The *ksr-1* gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* 83: 903-913.
251. Cacace AM, Michaud NR, Therrien M, Mathes K, Copeland T, et al. (1999) Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Mol Cell Biol* 19: 229-240.
252. Muller J, Ory S, Copeland T, Piwnicka-Worms H, Morrison DK (2001) C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell* 8: 983-993.
253. Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, et al. (2002) Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* 4: 343-350.
254. Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E (2004) Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* 7: 33-44.
255. Furthauer M, Lin W, Ang SL, Thisse B, Thisse C (2002) Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol* 4: 170-174.
256. Tsang M, Friesel R, Kudoh T, Dawid IB (2002) Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* 4: 165-169.
257. Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, et al. (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280: 1082-1086.
258. Bivona TG, Perez De Castro I, Ahearn IM, Grana TM, Chiu VK, et al. (2003) Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* 424: 694-698.
259. Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ (1994) Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J* 13: 4269-4277.
260. Pol A, Calvo M, Enrich C (1998) Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett* 441: 34-38.
261. Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL (1996) Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274: 2086-2089.

262. Kranenburg O, Verlaan I, Moolenaar WH (1999) Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *J Biol Chem* 274: 35301-35304.
263. Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, et al. (1998) MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281: 1668-1671.
264. Teis D, Wunderlich W, Huber LA (2002) Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell* 3: 803-814.
265. Oksvold MP, Skarpen E, Wierod L, Paulsen RE, Huitfeldt HS (2001) Re-localization of activated EGF receptor and its signal transducers to multivesicular compartments downstream of early endosomes in response to EGF. *Eur J Cell Biol* 80: 285-294.
266. Taub N, Teis D, Ebner HL, Hess MW, Huber LA (2007) Late endosomal traffic of the epidermal growth factor receptor ensures spatial and temporal fidelity of mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Biol Cell* 18: 4698-4710.
267. Kolch W (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 827-837.
268. Zhong SP, Ma WY, Dong Z (2000) ERKs and p38 kinases mediate ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10. *J Biol Chem* 275: 20980-20984.
269. Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl)* 74: 589-607.
270. Shaulian E, Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20: 2390-2400.
271. Meloche S, Pouyssegur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26: 3227-3239.
272. Sears R, Leone G, DeGregori J, Nevins JR (1999) Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* 3: 169-179.
273. Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, et al. (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14: 2501-2514.
274. Sahu RP, Batra S, Kandala PK, Brown TL, Srivastava SK (2011) The role of K-ras gene mutation in TRAIL-induced apoptosis in pancreatic and lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 67: 481-487.
275. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16: 1909-1920.
276. Joshi B, Cai AL, Keiper BD, Minich WB, Mendez R, et al. (1995) Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *J Biol Chem* 270: 14597-14603.
277. Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, et al. (1999) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 18: 270-279.
278. Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, et al. (2001) Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J* 20: 4370-4379.
279. Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, et al. (2006) The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* 25: 2781-2791.
280. Lavoie H, Therrien M (2010) Mécanisme d'activation de l'oncogène BRAF. Médecine/Sciences (Paris).

281. Goetz CA, O'Neil JJ, Farrar MA (2003) Membrane localization, oligomerization, and phosphorylation are required for optimal raf activation. *J Biol Chem* 278: 51184-51189.
282. Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.
283. Weber CK, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR (2001) Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res* 61: 3595-3598.
284. Farrar MA, Alberol-Ila J, Perlmutter RM (1996) Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* 383: 178-181.
285. Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, et al. (1996) Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 383: 181-185.
286. Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W (2006) Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol* 26: 2262-2272.
287. Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R (2005) Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell* 20: 963-969.
288. Dougherty MK, Muller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, et al. (2005) Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17: 215-224.
289. Ritt DA, Monson DM, Specht SI, Morrison DK (2010) Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling. *Mol Cell Biol* 30: 806-819.
290. Rajakulendran T, Sahmi M, Lefrancois M, Sicheri F, Therrien M (2009) A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* 461: 542-545.
291. Lavoie H, Sahmi M, Maisonneuve P, Marullo SA, Thevakumaran N, et al. (2018) MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature* 554: 549-553.
292. Brennan DF, Dar AC, Hertz NT, Chao WC, Burlingame AL, et al. (2011) A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature* 472: 366-369.
293. Haling JR, Sudhamsu J, Yen I, Sideris S, Sandoval W, et al. (2014) Structure of the BRAF-MEK complex reveals a kinase activity independent role for BRAF in MAPK signaling. *Cancer Cell* 26: 402-413.
294. Miller WE, Raab-Traub N (1999) The EGFR as a target for viral oncoproteins. *Trends Microbiol* 7: 453-458.
295. Battcock SM, Collier TW, Zu D, Hirasawa K (2006) Negative regulation of the alpha interferon-induced antiviral response by the Ras/Raf/MEK pathway. *J Virol* 80: 4422-4430.
296. Scherbik SV, Brinton MA (2010) Virus-induced Ca²⁺ influx extends survival of west nile virus-infected cells. *J Virol* 84: 8721-8731.
297. Albarnaz JD, De Oliveira LC, Torres AA, Palhares RM, Casteluber MC, et al. (2014) MEK/ERK activation plays a decisive role in yellow fever virus replication: implication as an antiviral therapeutic target. *Antiviral Res* 111: 82-92.
298. Gupta N, Bhaskar AS, Lakshmana Rao PV (2011) Transcriptional regulation and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway after Japanese encephalitis virus infection in neuroblastoma cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62: 110-121.
299. Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310.

300. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Chappell WH, Russo S, et al. (2009) Emerging Raf inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs* 14: 633-648.
301. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Chappell WH, Russo S, et al. (2010) Emerging MEK inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs* 15: 203-223.
302. Kidger AM, Siphthorp J, Cook SJ (2018) ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway. *Pharmacol Ther* 187: 45-60.
303. Jones HA, Hahn SM, Bernhard E, McKenna WG (2001) Ras inhibitors and radiation therapy. *Semin Radiat Oncol* 11: 328-337.
304. Holderfield M (2018) Efforts to Develop KRAS Inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8.
305. Cheng Y, Tian H (2017) Current Development Status of MEK Inhibitors. *Molecules* 22.
306. Owczarek W, Slowinska M, Lesiak A, Ciazynska M, Maciag A, et al. (2017) The incidence and management of cutaneous adverse events of the epidermal growth factor receptor inhibitors. *Postepy Dermatol Alergol* 34: 418-428.
307. Mortola E, Larsen A (2010) Bluetongue virus infection: activation of the MAP kinase-dependent pathway is required for apoptosis. *Res Vet Sci* 89: 460-464.
308. Mohl BP, Emmott E, Roy P (2017) Phosphoproteomic Analysis Reveals the Importance of Kinase Regulation During Orbivirus Infection. *Mol Cell Proteomics* 16: 1990-2005.
309. Lv S, Xu QY, Sun EC, Zhang JK, Wu DL (2016) Dissection and integration of the autophagy signaling network initiated by bluetongue virus infection: crucial candidates ERK1/2, Akt and AMPK. *Sci Rep* 6: 23130.
310. Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
311. Brent R, Ptashne M (1985) A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. *Nature* 314: 198.
312. Vidalain PO, Jacob Y, Hagemeijer MC, Jones LM, Neveu G, et al. (2015) A field-proven yeast two-hybrid protocol used to identify coronavirus-host protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 1282: 213-229.
313. Nayduch D, Lee MB, Sasaki CA (2014) The reference transcriptome of the adult female biting midge (*Culicoides sonorensis*) and differential gene expression profiling during teneral, blood, and sucrose feeding conditions. *PLoS One* 9: e98123.
314. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, et al. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13: 2498-2504.
315. Trask SD, Boehme KW, Dermody TS, Patton JT (2013) Comparative analysis of Reoviridae reverse genetics methods. *Methods* 59: 199-206.
316. Pullinger GD, Guimera Busquets M, Nomikou K, Boyce M, Attoui H, et al. (2016) Identification of the Genome Segments of Bluetongue Virus Serotype 26 (Isolate KUW2010/02) that Restrict Replication in a *Culicoides sonorensis* Cell Line (KC Cells). *PLoS One* 11: e0149709.
317. Lv S, Xu Q, Sun E, Yang T, Li J, et al. (2015) Autophagy Activated by Bluetongue Virus Infection Plays a Positive Role in Its Replication. *Viruses* 7: 4657-4675.
318. Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, et al. (2004) A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303: 540-543.
319. Paul P, Munz C (2016) Autophagy and Mammalian Viruses: Roles in Immune Response, Viral Replication, and Beyond. *Adv Virus Res* 95: 149-195.

320. Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z (2011) Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol* 12: 226.
321. Mairiang D, Zhang H, Sodja A, Murali T, Suriyaphol P, et al. (2013) Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito. *PLoS One* 8: e53535.
322. de Chassey B, Navratil V, Tafforeau L, Hiet MS, Aublin-Gex A, et al. (2008) Hepatitis C virus infection protein network. *Mol Syst Biol* 4: 230.
323. Calderwood MA, Venkatesan K, Xing L, Chase MR, Vazquez A, et al. (2007) Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7606-7611.
324. Mortola E, Noad R, Roy P (2004) Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *J Virol* 78: 2875-2883.
325. Everett RD, Boutell C, Hale BG (2013) Interplay between viruses and host sumoylation pathways. *Nat Rev Microbiol* 11: 400-411.
326. Oki AT, Huang B, Beyer AR, May LJ, Truchan HK, et al. (2016) Anaplasma phagocytophilum APH0032 Is Exposed on the Cytosolic Face of the Pathogen-Occupied Vacuole and Co-opts Host Cell SUMOylation. *Front Cell Infect Microbiol* 6: 108.
327. Zhang J, Kinch LN, Cong Q, Weile J, Sun S, et al. (2017) Assessing predictions of fitness effects of missense mutations in SUMO-conjugating enzyme UBE2I. *Hum Mutat* 38: 1051-1063.
328. Bourai M, Lucas-Hourani M, Gad HH, Drosten C, Jacob Y, et al. (2012) Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *J Virol* 86: 3121-3134.
329. Chen Y, Chen Q, Li M, Mao Q, Chen H, et al. (2017) Autophagy pathway induced by a plant virus facilitates viral spread and transmission by its insect vector. *PLoS Pathog* 13: e1006727.
330. Reed LJ, Muench M (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27: 493.
331. Caignard G, Komarova AV, Bourai M, Mourez T, Jacob Y, et al. (2009) Differential regulation of type I interferon and epidermal growth factor pathways by a human Respirivirus virulence factor. *PLoS Pathog* 5: e1000587.
332. Lobeck I, Donnelly B, Dupree P, Mahe MM, McNeal M, et al. (2016) Rhesus rotavirus VP6 regulates ERK-dependent calcium influx in cholangiocytes. *Virology* 499: 185-195.
333. Terai K, Matsuda M (2006) The amino-terminal B-Raf-specific region mediates calcium-dependent homo- and hetero-dimerization of Raf. *EMBO J* 25: 3556-3564.
334. Schumann M, Dobbelstein M (2006) Adenovirus-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation during the late phase of infection enhances viral protein levels and virus progeny. *Cancer Res* 66: 1282-1288.
335. Ford PW, Bryan BA, Dyson OF, Weidner DA, Chintalgattu V, et al. (2006) Raf/MEK/ERK signalling triggers reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *J Gen Virol* 87: 1139-1144.
336. Li X, Du S, Avey D, Li Y, Zhu F, et al. (2015) ORF45-Mediated Prolonged c-Fos Accumulation Accelerates Viral Transcription during the Late Stage of Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol* 89: 6895-6906.

337. Xia L, Huang W, Tian D, Zhu H, Zhang Y, et al. (2012) Upregulated FoxM1 expression induced by hepatitis B virus X protein promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 57: 600-612.
338. Panousis CG, Rowe DT (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 associates with and is a substrate for mitogen-activated protein kinase. *J Virol* 71: 4752-4760.
339. Cyprian FS, Al-Farsi HF, Vranic S, Akhtar S, Al Moustafa AE (2018) Epstein-Barr Virus and Human Papillomaviruses Interactions and Their Roles in the Initiation of Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Progression. *Front Oncol* 8: 111.
340. Bonjardim CA (2017) Viral exploitation of the MEK/ERK pathway - A tale of vaccinia virus and other viruses. *Virology* 507: 267-275.
341. Menzel N, Fischl W, Hueging K, Bankwitz D, Frentzen A, et al. (2012) MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog* 8: e1002829.
342. Kew VG, Yuan J, Meier J, Reeves MB (2014) Mitogen and stress activated kinases act cooperatively with CREB during the induction of human cytomegalovirus immediate-early gene expression from latency. *PLoS Pathog* 10: e1004195.
343. Zheng K, Xiang Y, Wang X, Wang Q, Zhong M, et al. (2014) Epidermal growth factor receptor-PI3K signaling controls cofilin activity to facilitate herpes simplex virus 1 entry into neuronal cells. *MBio* 5: e00958-00913.
344. Woodson EN, Kedes DH (2012) Distinct roles for extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 in the structure and production of a primate gammaherpesvirus. *J Virol* 86: 9721-9736.
345. Woodson EN, Anderson MS, Loftus MS, Kedes DH (2014) Progressive accumulation of activated ERK2 within highly stable ORF45-containing nuclear complexes promotes lytic gammaherpesvirus infection. *PLoS Pathog* 10: e1004066.
346. Barber SA, Bruett L, Douglass BR, Herbst DS, Zink MC, et al. (2002) Visna virus-induced activation of MAPK is required for virus replication and correlates with virus-induced neuropathology. *J Virol* 76: 817-828.
347. Pleschka S (2008) RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biol Chem* 389: 1273-1282.
348. Cunningham KA, Chapman NM, Carson SD (2003) Caspase-3 activation and ERK phosphorylation during CVB3 infection of cells: influence of the coxsackievirus and adenovirus receptor and engineered variants. *Virus Res* 92: 179-186.
349. Smith JL, Stein DA, Shum D, Fischer MA, Radu C, et al. (2014) Inhibition of dengue virus replication by a class of small-molecule compounds that antagonize dopamine receptor d4 and downstream mitogen-activated protein kinase signaling. *J Virol* 88: 5533-5542.
350. Planz O, Pleschka S, Ludwig S (2001) MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells. *J Virol* 75: 4871-4877.
351. Raung SL, Chen SY, Liao SL, Chen JH, Chen CJ (2007) Japanese encephalitis virus infection stimulates Src tyrosine kinase in neuron/glia. *Neurosci Lett* 419: 263-268.
352. Cai Y, Liu Y, Zhang X (2007) Suppression of coronavirus replication by inhibition of the MEK signaling pathway. *J Virol* 81: 446-456.
353. Zampieri CA, Fortin JF, Nolan GP, Nabel GJ (2007) The ERK mitogen-activated protein kinase pathway contributes to Ebola virus glycoprotein-induced cytotoxicity. *J Virol* 81: 1230-1240.

354. Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, et al. (2001) Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* 3: 301-305.
355. Ludwig S, Wolff T, Ehrhardt C, Wurzer WJ, Reinhardt J, et al. (2004) MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS Lett* 561: 37-43.



Annexe 1 : Exemples de mécanismes de modulations viro-induites de la voie MAPK/ERK (liste non exhaustive).

En rouge ont été indiqués les virus oncogènes, en vert les virus à ADN et en bleu les virus à ARN. NC : information non connue. Le tableau a été réalisé à partir de données issues des publications suivantes : [294,296-298,331,332,334-355].

Virus	Protéine virale	Niveau de la modulation de la cascade/partenaire	Conséquence pour le virus	Conséquence pour la cellule	Références
adénovirus (ADNV)	phase tardive du cycle viral	c-myc	favorise la réplication virale	NC	334
herpèsvirus humain 8 (sarcome de Kaposi)	ORF45	FOS	permet la sortie de l'état de latence, favorise la réplication virale	modification du cytosquelette d'actine	335, 336
papillomavirus (HPV et BPV)	E5	PDGFR	responsable de la pathogénicité	HPV module l'activité de l'EGFR	294
rétrovirus érythroblastose aviaire (AEV)	v-ErbB	GRB2	NC	NC	294
virus d'Epstein-Barr (EBV)	LMP1	induit l'expression de l'EGFR	NC	NC	294
virus d'Epstein-Barr (EBV)	LMP2A	ERK1/RAS	NC	NC	338, 339
virus de la forêt de smilki (SFV)	SFGF	entre en compétition avec l'EGF pour la liaison au récepteur ErbB	favorise la réplication des nouvelles particules virales	stimule la mitose, stimule la croissance cellulaire	340
virus de l'hépatite B (VHB)	X	module positivement FoxM1 (Forkhead box M1)	NC	induit des carcinomes hépatocellulaires	294, 337
virus de l'hépatite C (VHC)	protéines du core (E2) NS5A	Raf AP-1	favorise la réplication virale : le traitement aux inhibiteurs diminuent l'inféctiosité virale	augmentation de l'activité de NF- κ B dépendant de l'expression de TGF α , diminue la prolifération des cellules T résultant en l'inhibition de l'expression des gènes IL-2 et IL-2R α	341
virus du myxome (MYXV)	MGF	entre en compétition avec l'EGF pour la liaison au récepteur ErbB-2/3	favorise la réplication des nouvelles particules virales	stimule la mitose, stimule la croissance cellulaire	340
cytomégalovirus (HCMV)	NC	MSK	permet la sortie de l'état de latence, favorise la réplication virale	phosphorylation de l'histone H3 pour le remodelage de la chromatine	342
herpès simplex de type 1 (HSV-1)	protéine d'enveloppe	RTK	permet l'entrée dans la cellule hôte favorise la réplication virale : le traitement aux inhibiteurs diminuent le titre viral	réorganisation du cytosquelette, inactivation de la cofiline et favorise la polymérisation des filaments d'actine	343
rhadinovirus du singe rhésus	ORF45	ERK2	favorise l'expression des gènes lytiques et la production virale	NC	344, 345
virus de la vaccine (VACV)	VGF	entre en compétition avec l'EGF pour la liaison au récepteur ErbB-1	favorise la virulence du virus	stimule la mitose, stimule la croissance cellulaire	340
virus du molluscum contagiosum (MCV)	NC	entre en compétition avec l'EGF pour la liaison au récepteur ErbB-1	favorise la réplication des nouvelles particules virales	stimule la mitose, stimule la croissance cellulaire	340
virus Visna (VMV)	Rev	NC	contribue à la pathogénicité neurodégénérative virale, favorise la réplication virale : le traitement aux inhibiteurs abolit la réplication virale	NC	346

Rotavirus Rhesus (RRV)	VP6	un import de calcium induit la phosphorylation des protéines ERK1/2	favorise la réplication virale, responsable de la pathogenèse du virus	NC	332
SARS-CoV	S	PKC α	permet l'activation du promoteur COX-2 induit par la protéine S ainsi que la production de la protéine COX-2	production de cytokines	347
virus Coxsachie B3 (CVB3)	VP1-3	RAS	favorise la réplication virale : le traitement aux inhibiteurs la production des protéines virales	induction caspase 3	348
virus de la dengue (DENV)	NC	NC	favorise la réplication virale : le traitement aux inhibiteurs diminuent la réplication virale	NC	349
virus du nil occidental (VNO)	NC	import de calcium	favorise la réplication virale	augmentation du clivage de la caspase 3	296
virus de la fièvre jaune (YFV)	NC	NC	augmenter la production de nouvelle particule virale, favorise la réplication virale : le traitement aux inhibiteurs abolit la réplication virale	NC	297
virus de la maladie de Borna (BDV)	NC	NC	la voie est essentielle pour la propagation du virus	NC	350
virus de l'encéphalite de Saint-Louis (VESL)	NC	NC	augmente la production de nouvelle particule virale	NC	297
virus de l'encéphalite japonaise (JEV)	NC	NC	permet au virus d'induire des cytokines pro-inflammatoires et de la neurotoxicité	induit l'activation de la caspase 3 pour permettre l'apoptose	298, 351
virus de l'hépatite murine (MHV)	NC	NC	favorise la synthèse des ARN	NC	352
virus Ebola (EBOV)	GP/VP40	ERK2 ?	responsable de la cytotoxicité du virus	production de cytokines	353
virus influenza A et B (FLUAV et FLUBV)	hémagglutinine (HA)	PKC α	favorise la réplication virale, permettant une croissance virale efficace, contrôle l'export nucléaire des RNPs en interférant avec l'activité d'export nucléaire de la protéine NEP	production de cytokines	354, 355
virus parainfluenza de type 3 (hPIV3)	C	GRB2	activation des facteurs de traduction pour la réplication virale	NC	331
virus respiratoire syncytial (RSV)	NC	PKC	nécessaire pour une infection efficace, régulation de la production du gène RANTES	NC	347
virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)	gp120 Tat Nef	ERK2/Raf	favorise l'assemblage, la libération et la transmission des particules virales, permet la translocation nucléaire pour favoriser son intégration, activation des facteurs de transcription	réorganisation du cytosquelette d'actine entraînant une réponse chimiotactique, activation des facteurs de transcription AP1 et NF- κ B	347

Annexe 2 : Oligonucléotides utilisés pour réaliser les clonages, mutagénèses et qPCRs.

Le premier tableau décrit les oligonucléotides qui ont été utilisés pour les mutagénèses et les qPCRs. Les trois tableaux suivants décrivent les oligonucléotides qui ont été utilisés pour le clonage par recombinaison Gateway®. Une séquence contenant des sites de recombinaisons attB précède les oligonucléotides utilisés pour le clonage par recombinaison Gateway®.

en sens : ggggacaactttgtacaaaaaagtggc, en anti-sens : ggggacaactttgtacaagaaagtgg.

Mutations/Gène	Oligonucléotide sens (Sqc 5' -> 3')	Oligonucléotide anti-sens (Sqc 5' -> 3')	Utilisation
NS3_ALL-EEE BTV-8 WT	CTATTAGTAGCGGCTGT GGTTGAGGAGGAGACAT CAGTTTGTACC	GGTACAAACTGATGTCTCC TCCTCAACCACAGCCGCTA CTAATAG	Mutagénèse
NS3_1-117 BTV-8 WT	GATTGAAGAAGAAAGAT ATCATCATACACACTAC	GTAGTGTGTATGATGATAT CTTCTTCTTCAATC	Mutagénèse
NS3_Δ118-182 (aa117) BTV-8 WT	TGATGGTTTGATTTAAA TGTGAAAGAG	CTCTTTCACATTTAAATCA AACCATCA	Mutagénèse
NS3_Δ118-182 (aa183) BTV-8 WT	TGATGGTTTGATTTAAA TGTGAAAGAG	CTCTTTCACATTTAAATCA AACCATCA	Mutagénèse
NS3_1-117 BTV-27Y WT	GAAGAAGAAACGATGA ATCATACATATAAC	GTTATATGTATGATTCA TCGTTTCTTCTTC	Mutagénèse
NS3_Δ118-182 (aa117) BTV-27Y WT	CGATTTAGGTGGAATGA AGAAGAAACGAATTCTC ATACATATAACGATG CTG	CAGCATCGTTATATGTATG AGAATTCGTTTCTTCTTCA TTCCACCTAAATCG	Mutagénèse
NS3_Δ118-182 (aa182) BTV-27Y WT	GTGCTACATTTTTGATG ATGGTTTGCGAATTCAG TGAAAGAGGCTTGAATC AGCAAATT	AATTTGCTGATTCAAGCCT CTTTCAGTGAATTCGCAAA CCATCATCAAAATGTAGC AC	Mutagénèse
NS4_L63Q BTV-8 WT	CCAACCTCCCGCATTTGC ATCTCCACCTCC	GGAGGTGGAGATGCAAAT GCGGGAGTTGG	Mutagénèse
GAPDH	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	ACTCCACGACGTAATCAG CG	q-PCR
NS3 BTV-8 WT	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	AAACTCATCCTCACCGCATC	q-PCR
NS4 BTV-8 WT	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	TACCCATCTTCTCCATTTCG	q-PCR
RasGRP1	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	CCGTTGCACAGAGCAATA GA	q-PCR

Gène	Oligonucléotide sens (Seq 5' -> 3')	Oligonucléotide anti-sens (Seq 5' -> 3')	Utilisation
VP1 BTV-8 WT	ATGGTCGCAATCACCGT GCAA	TTAAACGAACTGGTTTTCA AGATTTCTA	Clonage Gateway® des ORFs
VP2 BTV-8 WT	ATGGAGGAGCTAGCGAT TCCGATT	TTATACATTGAGCAGCTTA GTTAACAT	Clonage Gateway® des ORFs
VP3 BTV-8 WT	ATGGCTGCTCAGAATGA GCAGCGT	TTACACAGTTGGCGCAGCC AGCTT	Clonage Gateway® des ORFs
VP4 BTV-8 WT	ATGCCTGAGCCACACGC AGTA	TTATAAGTGACGCAGTAAT TCTAGCC	Clonage Gateway® des ORFs
VP5 BTV-8 WT	ATGGGGAAAATCATAAA GTCCCTAAGCCG	TTAGGCATTTCTTAAGAAG AGTGGGATA	Clonage Gateway® des ORFs
VP6 BTV-8 WT	ATGTCACTAGCGATACT TCTTGCACCC	TTAGAGGTGATCGATCAA ATGCAGGAA	Clonage Gateway® des ORFs
VP7 BTV-8 WT	ATGGACACTATCGCTGC AAGA	TTACACATAGGCGGCGCG TGCAA	Clonage Gateway® des ORFs
NS1 BTV-8 WT	ATGGAGCGCTTTTTGAG AAAATACAAC	TTAATACTCCATCCACATC TGAGAC	Clonage Gateway® des ORFs
NS2 BTV-8 WT	ATGGAGCAAAAGCAACG TAGATTTACT	TTAAACGCCGACCGGCAAT ATGA	Clonage Gateway® des ORFs
NS2_1-130 BTV-8 WT	ATGGAGCAAAAGCAA CGTAG	TTACGGTTGCACGATTCCC ATTG	Clonage Gateway® des ORFs
NS2_131-270 BTV-8 WT	ATGTATATGCGGAATGA TTTTGA	TTACTTAGTTATATGAGTT CTTG	Clonage Gateway® des ORFs
NS2_271-357 BTV-8 WT	ATGGAATACATCGAGAA GGTCGC	TTAAACGCCGACCGGCA ATATGA	Clonage Gateway® des ORFs
NS3 BTV-8 WT	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAA	TTAGGTTAATGGCATTTTCG AAACCATC	Clonage Gateway® des ORFs
NS3_118-229 BTV-8 WT	ATGGCAATCATACACAC TACTCTAT	TTAGGTTAATGGCATTTTCG AAACCA	Clonage Gateway® des ORFs
NS3_181-229 BTV-8 WT	ATGTGCGCAAAGAGTGA AAGAGC	TTAGGTTAATGGCATTTTCG AAACCA	Clonage Gateway® des ORFs
NS3A BTV-8 WT	ATGAAACATAATCAAGA CAGAGTTGAAG	TTAGGTTAATGGCATTTTCG AAACCATCCAG	Clonage Gateway® des ORFs
NS4 BTV-8 WT	ATGATGGTGAGGGGG CG	TTAGAACTACCATCTTCC TCCATTC	Clonage Gateway® des ORFs
NS5 BTV-8 WT	ATGACACCATCTCTCAA CCACC	TTACATCATCACGAAACGC TTCCGCG	Clonage Gateway® des ORFs
NS5A BTV-8 WT	ATGCTCCGAGTGCACCG ATGCC	TTACATCATCACGAAACGC TTCCGCG	Clonage Gateway® des ORFs

Gène	Oligonucléotide sens (Seq 5' -> 3')	Oligonucléotide anti-sens (Seq 5' -> 3')	Utilisation
VP1 BTV-27Y WT	ATGATCGCAATTACCGT GCGAG	TTATCAAACGAATTGGTTT TCCAAA	Clonage Gateway® des ORFs
VP2 BTV-27Y WT	ATGGATGAGCTGGTTAT ACCAAT	TTACTACACGTTAAGTAAT TTAGTC	Clonage Gateway® des ORFs
VP3 BTV-27Y WT	ATGGCTGCTCAGAATGA GCAGAAAAC	TTATTACGCAGTCGGCGC GGCTA	Clonage Gateway® des ORFs
VP4 BTV-27Y WT	ATGCCTGGGCCACACGC AGTGTGTT	TTATCATAGGTGACGCAGC AGTTCCA	Clonage Gateway® des ORFs
VP5 BTV-27Y WT	ATGGGGAAGATCATTAA ATCGCTTAG	TTATCATAAGAGGAGGGG AATGTCT	Clonage Gateway® des ORFs
VP6 BTV-27Y WT	ATGTCGGCTGCGATACT TCTTGCAC	TTATTAGAGGTGATCGATT AAATGCAGG	Clonage Gateway® des ORFs
VP7 BTV-27Y WT	ATGGACACTATTGCAGC GAGGG	TTACTACACATAAGCGGCA CGAG	Clonage Gateway® des ORFs
NS1 BTV-27Y WT	ATGGAGCGCTTTTTGAG GAAGTAC	TTAACGTTTCAGCCCACATC TGC	Clonage Gateway® des ORFs
NS2 BTV-27Y WT	ATGGGAGGGGTAAAAA ATCCTTG	TTAGACACCGATCGGCAAT GTG	Clonage Gateway® des ORFs
NS3 BTV-27Y WT	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	TTAGGTAAATGGTATTTTCG AAACCAT	Clonage Gateway® des ORFs
NS3_181-229 BTV-27Y WT	ATGCGCAAGGAGTGAAA GAGGC	TTAGGTAAATGGTATTTTCG AAACCAT	Clonage Gateway® des ORFs
NS4 BTV-27Y WT	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	TTACCCATCCTCTACTGCT CG	Clonage Gateway® des ORFs
NS5 BTV-27Y WT	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	TTACATCATCACGAAACGC TTCTG	Clonage Gateway® des ORFs
NS3 BTV-1 WT	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAA	TTAGGTAAATGGTAATTCG AAACCATCT	Clonage Gateway® des ORFs
NS3 EHDV WT	ATGCCAACTTTGTACAA AAAA	TTATCTGGTGAGTTCCGG TGG	Clonage Gateway® des ORFs
NS3 AHSV WT	ATGAATCTAGCTACAAT CGCC	CTAGCTCTCGCCATACTT AAT	Clonage Gateway® des ORFs
NS3 EEV WT	ATGTATCCGGTACTATC AAGA	CTAATGGGCCGCATCTCC GAA	Clonage Gateway® des ORFs

Gène	Oligonucléotide sens (Seq 5' -> 3')	Oligonucléotide anti-sens (Seq 5' -> 3')	Utilisation
AATF bovin	ATGGCGGGACCGCAGTC CCTGGC	TTAGGCCCCGTGGCTGTCA TCACG	Clonage Gateway® des ORFs
BECN1 bovin	ATGGAGGGGTCTAAGAC ATCC	TTATTTGTTATAAACTGT GAGG	Clonage Gateway® des ORFs
BECN1 culicoïde	ATGGCTTGGAGTTCAAA ATCAGTGG	TTAGGAATTAACATCTTGA GATGACG	Clonage Gateway® des ORFs
CCHCR1 bovin	ATGTTTCGACCTTCAGG TTCCAC	TTAGAGGCAGACTGAAGA GGAGG	Clonage Gateway® des ORFs
CREB3 bovin	ATGGAGCTGGAATTGGA TGCT	TTAGCCTGAGTATCTGTCC TG	Clonage Gateway® des ORFs
C1QBP bovin	ATGTTCCAGCTGCTGCG CTGCGTGC	TTACTTGCTTTTGACAAAA CCTTTG	Clonage Gateway® des ORFs
C1QBP culicoïde	ATGTTTCAGATTAGTCCG TACTGC	TTATTTCTTAGCAGTAAAT TTTG	Clonage Gateway® des ORFs
IMMT bovin	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	TTACGGGACTCTTCCTAGG CCTTC	Clonage Gateway® des ORFs
KIF12 bovin	ATGGAGGAACGCGGGTC GCCCCGACGGGGACCCC	TTAACAGGCACGGAGGGC CTGGCTAGGGCTCCG	Clonage Gateway® des ORFs
SIKE1 bovin	ATGAGCTGCACCATCGA AAGATTC	TTATTTGATGCCTTGGGAA GCAGTG	Clonage Gateway® des ORFs
TACC1 bovin	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	TTAGTCCGTCTTTCCCAGC TTGG	Clonage Gateway® des ORFs
TSG101 bovin	ATGCTATCCGGGCTGAT CCAAA	TTAGTAGAGGTCACTGAG ACCGC	Clonage Gateway® des ORFs
WTAP bovin	ATGACCAACGAAGAACC TCTT	TTACCTATCAGGCGTAAAC TT	Clonage Gateway® des ORFs
WTAP_45-369 bovin	ATGACAGATCTCAACTC TAATGA	TTACCTATCAGGCGTAAAC TT	Clonage Gateway® des ORFs
WTAP_263-396 bovin	ATGGCAGAGGCCACAGG TAAAG	TTACCTATCAGGCGTAAAC TT	Clonage Gateway® des ORFs

Annexe 3 : Liste des interacteurs identifiés par double-hybride à partir de la banque MDBK pour les protéines codées par le BTV-8.

Cette liste a été obtenue à partir d'analyses comparatives des séquences des interacteurs cellulaires à des séquences de référence spécifiques du bovin (*Bos Taurus*). Les chiffres correspondent au nombre de fois où l'interaction a été identifiée. L'ensemble des protéines orthologues chez l'*Homo sapiens* a été indiqué. En vert ont été indiquées les interactions identifiées deux fois ou plus sélectionnées à la suite de l'application du filtre statistique. Les initiales NA (Non Assigné) ont été marquées pour l'ensemble des interacteurs non identifiés.

Identifiant des interacteurs		Appâts viraux														Total
<i>Homo sapiens</i>	<i>Bos Taurus</i>	NS1	NS2	NS2(1-130)	NS3	NS3(181-229)	NS3(Δ 118-182)	NS3A	NS4	NS5	NS5(10-59)	VP2	VP3	VP6	VP7	
UBA7	UBA7	6											11			17
METTL26	METTL26	4														4
UBE2I	UBE2I	3											2		2	7
RPL19	RPL19	1											1		1	3
NA	LOC539472	1													1	2
NA	GBF1	1														1
GRIN2C	GRIN2C	1														1
GSTA2	GSTA1	1														1
RPL10	RPL10	1														1
RPS4X	RPS4X		1													1
PAICS	PAICS			119												119
NA	F1MY51			2			1									3
NA	LOC512486			1												1
RPLP1	RPLP1			1												1
NA	TMEM236			1												1
CREB3	CREB3				2											2
CCDC85C	CCDC85C					4	38									42
RPS5	RPS5					2	6									8
GOLGA2	GOLGA2						31									31
TXNDC11	TXNDC11						30									30
TSG101	TSG101						27									27
PDE4DIP	PDE4DIP						14									14
TACC1	TACC1						11									11
NA	ARFGEF3						5									5
NA	CECR2						4									4
COG8	COG8						4									4
IMMT	IMMT						4									4
ACTN1	ACTN1						3									3
NA	caV2.1						3									3
BSPRY	BSPRY						2									2
KRT18	KRT18						2									2
MT-ATP6	ATP6						1		1							2
BTBD6	BTBD6						1									1
NA	F1N107						1									1
NA	FBXL19						1									1
HSD3B1	HSD3B1						1									1
PNMA1	PNMA1						1									1
SPEF1	SPEF1						1									1
NA	STT3B						1									1
SUCLG1	SUCLG1						1									1
FNDC3B	FNDC3B							3							1	4
LMNB1	LMNB1							1								1
WTAP	WTAP								34							34
AATF	AATF								23							23
KANSL2	KANSL2								18							18
KIF12	KIF12								18							18
PAWR	PAWR								17							17
BRD2	BRD2								7							7
LUC7L	LUC7L								6							6
CCHCR1	CCHCR1								7							7
GABARAPL2	GABARAPL2								2							2
KXD1	KXD1								2							2
MED21	MED21								2							2
PPP1R12A	PPP1R12A								2							2
PSMD14	PSMD14								2							2
SIKE1	SIKE1								2							2

RPL24	RPL24							1						1		2
ATP5G2	ATP5G2							1								1
C14orf2	C21H14orf2							1								1
CDCA7L	CDCA7L							1								1
NA	CDH20							1								1
MT-CO3	COIII							1								1
NA	EFTUD2							1								1
NA	FAM96B							1								1
NA	G3NoF2							1								1
MORC2	MORC2							1								1
NA	MYO5C							1								1
NDUFB8	NDUFB8							1								1
NA	NWD1							1								1
RPL26	RPL26							1								1
RPS23	RPS23							1								1
NA	RRP1B							1								1
NA	Tmcc3							1								1
TMEM11	TMEM11							1								1
USMG5	USMG5							1								1
HNRNPK	HNRNPK								5	8						13
GRN	GRN								3							3
MATN2	MATN2								2	1						3
NA	B5TM87								1							1
DCTN3	DCTN3								1							1
FBN2	FBN2								1							1
NA	MEGF6								1							1
MT-ND1	ND1								1							1
INO80C	T2R65A								1							1
UFD1L	UFD1L								1							1
C1QBP	C1QBP									2						2
ANAPC15	ANAPC15										1					1
FDPS	FDPS										1					1
NA	IQSEC1										1					1
EXOSC9	EXOSC9	1										7		5		13
CASP8AP2	CASP8AP2											6		1		7
PIAS2	PIAS2											1				1
TMEM208	TMEM208											1				1
VIM	VIM											1				1
MT-CO1	COX1												2	1		3
CTH	CTH												1			1
EWSR1	EWSR1												1			1
NDUFB10	NDUFB10												1			1
PLBD2	PLBD2												1			1
RPSA	RPSA												1			1
TAGLN2	TAGLN2												1			1
TRAPPC1	TRAPPC1												1			1
NA	RPL8													2		2
NA	C4BPA													1		1
RPL5	G3MYE2													1		1
MRPL52	MRPL52													1		1
NA	ODF3L2													1		1
RPL23	RPL23													1		1
RPL5	RPL5													1		1
S100A11	S100A11													1		1
Total		37	2	148	2	10	265	4	206	20	13	3	46	14	55	825
NA		17	1	24	0	4	71	0	44	3	2	0	16	4	34	220

Annexe 4 : Liste des interacteurs identifiés par double-hybride à partir de la banque MDBK pour les protéines codées par le BTV-27.

Cette liste a été obtenue à partir d'analyses comparatives des séquences des interacteurs cellulaires à des séquences de référence spécifiques du bovin (*Bos Taurus*). Les chiffres correspondent au nombre de fois où l'interaction a été identifiée. L'ensemble des protéines orthologues chez l'*Homo sapiens* a été indiqué. En vert ont été indiquées les interactions identifiées deux fois ou plus sélectionnées à la suite de l'application du filtre statistique. Les initiales NA (Non Assigné) ont été marquées pour l'ensemble des interacteurs non identifiés.

Identifiant des interacteurs		Appâts viraux								Total
<i>Homo sapiens</i>	<i>Bos Taurus</i>	NS1	NS3(Δ 118-182)	NS3(1-117)	NS3(181-229)	NS4	NS5	VP6	VP7	
SH3GLB1	SH3GLB1	29								29
UBE2I	UBE2I	26							5	31
EXOSC9	EXOSC9	17								17
HIPK2	HIPK2	16								16
SSX2IP	SSX2IP	12								12
RCBTB2	RCBTB2	11								11
CASP8AP2	CASP8AP2	4								4
PIAS3	PIAS3	3							1	4
TRAF4	TRAF4	3								3
PIAS1	PIAS1	2								2
PIAS2	PIAS2	2								2
RACK1	RACK1	2								2
RPL31	RPL31	2								2
RPS23	RPS23	2								2
UBA7	UBA7	2								2
RPS3A	RPS3A	2								2
ACTG1	ACTG1	1								1
NA	ATP7B	1								1
NA	C4BPA	1								1
CD151	CD151	1								1
NA	IQSEC1	1								1
MFHAS1	MFHAS1	1								1
MYL12A	MYL12A	1								1
NA	PAOX	1								1
RPSA	Q862H8	1								1
RPL18A	Q862R3	1								1
RPL3	RPL3	1								1
RPL7	RPL7	1								1
NA	SNRPC	1								1
NA	TSHZ2	1								1
GOLGA2	GOLGA2		30							30
CCDC85C	CCDC85C		28							28
KRT18	KRT18		20							20
IMMT	IMMT		16							16
PDE4DIP	PDE4DIP		10							10
TRAF2	TRAF2		9							9
TXNDC11	TXNDC11		7	2						9
BTBD6	BTBD6		7							7
TSG101	TSG101		7							7
TACC1	TACC1		5							5
DISC1	DISC1		4							4
RINT1	RINT1		4							4
ACTN1	ACTN1		3							3

NAP1L1	NAP1L1		2							2
BSPRY	BSPRY		1		1					2
NA	F1MY51		1					1		2
NA	TMEM236		1					1		2
NA	ANGPT2		1							1
AP2B1	AP2B1		1							1
NA	ARFGEF3		1							1
NA	caV2.1		1							1
NA	F1MK96		1							1
GCC1	GCC1		1							1
MRPL45	MRPL45		1							1
RBM39	RBM39		1							1
SLC39A8	SLC39A8		1							1
RPS11	RPS11			1						1
EEF1B2	EEF1B2				1					1
NOP53	GLTSCR2				1					1
PAWR	PAWR					22				22
MAPK7	MAPK7					14				14
KANSL2	KANSL2					8				8
PPP1R12A	PPP1R12A					3				3
JRKL	JRKL					2				2
TUSC1	TUSC1					2				2
EEF1A1	O18787					1				1
PDCD7	PDCD7					1				1
NA	SNX18					1				1
NA	TENM1					1				1
C1QBP	C1QBP	1					25			26
MEGF6	MEGF6						13			13
FBN2	FBN2						1			1
MATN2	MATN2						1			1
NA	OGT						1			1
GMCL1	GMCL1							3		3
FAM214A	FAM214A							1		1
SLCO3A1	SLCO3A1							1		1
BICDL2	BICDL2								9	9
NA	CECR2	1							2	3
ANXA1	ANXA1								1	1
NA	F1N107								1	1
HIST1H2BH	HIST2H2BE								1	1
RPS15A	LOC619131								1	1
UBC	UBB								1	1
ZDHHC13	ZDHHC13								1	1
Total		214	192	7	3	82	44	5	43	590
NA		63	28	4	0	27	3	0	18	143

Annexe 5 : Liste des interacteurs identifiés par double-hybride à partir de la banque KC pour les protéines codées par le BTV-8.

Cette liste a été obtenue à partir d'analyses comparatives des séquences des interacteurs cellulaires à des séquences de référence spécifiques du culicoïde (*Culicoides sonorensis*). Les chiffres correspondent au nombre de fois où l'interaction a été identifiée. Les noms des protéines orthologues chez *Homo sapiens* et chez *Drosophila melanogaster* ont été mentionnés. En vert ont été indiquées les interactions identifiées deux fois ou plus sélectionnées à la suite de l'application du filtre statistique. Les initiales NA (Non Assigné) ont été marquées pour l'ensemble des interacteurs non identifiés.

Identifiant des interacteurs cellulaires			Appâts viraux										Total
Homo sapiens	Drosophila melanogaster	Culicoides sonorensis	NS1	NS3	NS3(181-229)	NS3(Δ118-182)	NS4	NS5	VP2	VP4	VP7		
UBE2I	lwr	GAWMo1014534.1	28								21	49	
NA	Tsc1	GAWMo1004995.1	7									7	
ALDOA	Ald	GAWMo1011305.1	2									2	
RPL6	RpL6	GAWMo1000973.1	1									1	
RPS9	RpS9	GAWMo1007698.1	1									1	
CREG1	CREG	GAWMo1009157.1	1									1	
CLTA	Clc	GAWMo1015031.1	1									1	
ANXA7	AnxB9	GAWMo1015946.1	1									1	
RPLP1	RpLP1	GAWMo1008359.1		1								1	
EEF1G	Efigamma	GAWMo1011978.1			11							11	
NA	CG17068	GAWMo1001761.1			3							3	
BECN1	Atg6	GAWMo1004552.1					8					8	
DCTN1	Gl	GAWMo1016124.1					8					8	
MYH10	zip	GAWMo1006540.1					1					1	
NA	NA	GAWMo1008543.1					1					1	
PFDN1	CG13993	GAWMo1018068.1					1					1	
C1QBP	P32	GAWMo1008096.1						101				101	
EEF1A1	Ef1alpha100E	GAWMo1006579.1							4		1	5	
PUDP	Gs1l	GAWMo1003147.1							2			2	
PPP4C	Pp4-19C	GAWMo1002462.1							2			2	
HPGDS	GstS1	GAWMo1002203.1							1			1	
CKB	Argk	GAWMo1006044.1							1			1	
COL9A1	NA	GAWMo1003225.1							1			1	
SET	Set	GAWMo1006781.1							1			1	
PPP2CA	mts	GAWMo1006785.1							1			1	
NA	NA	GAWMo1007223.1							1			1	
RAB1A	Rab1	GAWMo1007808.1							1			1	
LRRC3B	CG16974	GAWMo1008420.1							1			1	
NA	NA	GAWMo1018190.1							1			1	
NA	NA	GAWMo1018666.1							1			1	
DHRS11	antdh	GAWMo1019032.1							1			1	
RPSA	sta	GAWMo1017517.1							1			1	
NA	CG2931	GAWMo1003505.1							1			1	
RPL13	RpL13	GAWMo1015387.1								1		1	
NME2	awd	GAWMo1015843.1									1	1	
RPL27	RpL27	GAWMo1005177.1									1	1	
Total			48	1	17	5	27	119	33	2	27	279	
NA			6	0	3	5	8	18	12	1	3	56	

Annexe 6 : Liste des interacteurs identifiés par double-hybride à partir de la banque KC pour les protéines codées par le BTV-27.

Cette liste a été obtenue à partir d'analyses comparatives des séquences des interacteurs cellulaires à des séquences de référence spécifiques du culicoïde (*Culicoides sonorensis*). Les chiffres correspondent au nombre de fois où l'interaction a été identifiée. Les noms des protéines orthologues chez l'*Homo sapiens* et chez *Drosophila melanogaster* ont été mentionnés. En vert ont été indiquées les interactions identifiées deux fois ou plus sélectionnées à la suite de l'application du filtre statistique. Les initiales NA (Non Assigné) ont été marquées pour l'ensemble des interacteurs non identifiés.

Identifiant des interacteurs cellulaires			Appâts viraux						Total
<i>Homo sapiens</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Culicoides sonorensis</i>	NS1	NS3(181-229)	NS3(Δ 118-182)	NS4	NS5	VP6	
UBE2I	lwr	GAWMo1014534.1	33						33
HIPK2	hipk	GAWMo1010880.1	6						6
GAPDH	Gapdh2	GAWMo1011279.1	1						1
EEF1G	Ef1gamma	GAWMo1011978.1		88	7				95
NA	NA	GAWMo1001761.1		9	1				10
ASH2L	ash2	GAWMo1011984.1		6					6
NA	NA	GAWMo1011906.1		2					2
HSPA8	Hsc70-4	GAWMo1007276.1		1					1
HM13	Spp	GAWMo1008890.1		1					1
DCTN1	Gl	GAWMo1016124.1				5			5
CKB	Argk	GAWMo1006044.1				1			1
C1QBP	P32	GAWMo1008096.1					93		93
CYP24A1	dib	GAWMo1014015.1						3	3
EIF5	eIF5	GAWMo1008010.1						1	1
Total			57	110	29	6	108	6	316
NA			17	3	21	0	15	2	58

Annexe 7 : Séquences peptidiques identifiées pour BRAF par spectrométrie de masse.

Ces séquences peptidiques ont été obtenues à la suite d'une approche de spectrométrie de masse en contexte infectieux et en surexpression de NS3 qui a permis d'identifier BRAF comme partenaire de NS3. Dans le tableau est mentionné la position de la séquence identifiée dans BRAF ainsi que le degré de confiance.

Séquence dans BRAF	Position dans BRAF	Degré de confiance : NS3 étiquette 3X FLAG	Degré de confiance : infection BTV
QTAQGMDYLHAK	[559-570]	haute	haute
LLFQGFR	[254-260]	haute	haute
IGDFGLATVK	[592-601]	haute	haute
SSSAPNVHINTIEPVNIDDLIR	[363-384]	haute	non déterminé
DQIIFMVGR	[663-671]	haute	non déterminé
LDALQQR	[89-95]	haute	non déterminé
GYLSPDLK	[672-680]	haute	non déterminé

Annexe 8 : Publication à laquelle j'ai été associée durant mon doctorat.

Pendant ma thèse, j'ai également eu l'occasion de participer à un autre projet, qui a été valorisé par une publication scientifique. Le manuscrit de cette publication est intégré dans la suite de l'annexe.



Nonstructural Protein NSs of Schmallenberg Virus Is Targeted to the Nucleolus and Induces Nucleolar Disorganization

Julie Gouzil,^{a,b,c} Aurore Fablet,^{a,b,c} Estelle Lara,^{a,b,c*} Grégory Caignard,^{a,b,c} Marielle Cochet,^{a,b,c} Cindy Kundlacz,^{a,b,c} Massimo Palmarini,^d Mariana Varela,^d Emmanuel Breard,^{a,b,c} Corinne Sailleau,^{a,b,c} Cyril Viarouge,^{a,b,c} Muriel Couplier,^{a,b,c} Stéphan Zientara,^{a,b,c} Damien Vitour^{a,b,c}

ANSES, UMR1161 Virologie, Laboratory for Animal Health, Maisons-Alfort, France^a; INRA, UMR1161, Maisons-Alfort, France^b; Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR1161 Virologie, Maisons-Alfort, France^c; MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, United Kingdom^d

ABSTRACT Schmallenberg virus (SBV) was discovered in Germany in late 2011 and then spread rapidly to many European countries. SBV is an orthobunyavirus that causes abortion and congenital abnormalities in ruminants. A virus-encoded non-structural protein, termed NSs, is a major virulence factor of SBV, and it is known to promote the degradation of Rpb1, a subunit of the RNA polymerase II (Pol II) complex, and therefore hampers global cellular transcription. In this study, we found that NSs is mainly localized in the nucleus of infected cells and specifically appears to target the nucleolus through a nucleolar localization signal (NoLS) localized between residues 33 and 51 of the protein. NSs colocalizes with nucleolar markers such as B23 (nucleophosmin) and fibrillarin. We observed that in SBV-infected cells, B23 undergoes a nucleolus-to-nucleoplasm redistribution, evocative of virus-induced nucleolar disruption. In contrast, the nucleolar pattern of B23 was unchanged upon infection with an SBV recombinant mutant with NSs lacking the NoLS motif (SBVΔNoLS). Interestingly, unlike wild-type SBV, the inhibitory activity of SBVΔNoLS toward RNA Pol II transcription is impaired. Overall, our results suggest that a putative link exists between NSs-induced nucleolar disruption and its inhibitory function on cellular transcription, which consequently precludes the cellular antiviral response and/or induces cell death.

IMPORTANCE Schmallenberg virus (SBV) is an emerging arbovirus of ruminants that spread in Europe between 2011 and 2013. SBV induces fetal abnormalities during gestation, with the central nervous system being one of the most affected organs. The virus-encoded NSs protein acts as a virulence factor by impairing host cell transcription. Here, we show that NSs contains a nucleolar localization signal (NoLS) and induces disorganization of the nucleolus. The NoLS motif in the SBV NSs is absolutely necessary for virus-induced inhibition of cellular transcription. To our knowledge, this is the first report of nucleolar functions for NSs within the *Bunyaviridae* family.

KEYWORDS Cellular shutoff, NSs, Schmallenberg virus, bunyavirus, nucleolus

In 2011, a febrile syndrome was reported in adult dairy cows in Germany and the Netherlands and a novel virus, Schmallenberg virus (SBV), was discovered and found to be pathogenic for ruminants (1). This newly identified virus belongs to the *Orthobunyavirus* genus within the *Bunyaviridae* family. After its first emergence in Northern Europe, SBV rapidly spread across many European countries, causing a large epidemic

Received 30 June 2016 Accepted 4 October 2016

Accepted manuscript posted online 19 October 2016

Citation 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. 2017. Nonstructural protein NSs of Schmallenberg virus is targeted to the nucleolus and induces nucleolar disorganization. *J Virol* 91:e01263-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01263-16>.

Editor Stanley Perlman, University of Iowa

Copyright © 2016 Gouzil et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Damien Vitour, damien.vitour@vet-alfort.fr.

* Present address: Estelle Lara, Quality Assistance S.A., Donstiennes, Belgium.

(2). SBV predominantly affects domestic and wild ruminants and is transmitted by multiple species of *Culicoides* biting midges (3–6). In pregnant females, transplacental infection can lead to stillbirths and abortions or cause severe congenital malformations in calves, lambs, and goat kids (1, 7, 8).

It is well established that the bunyavirus-encoded NSs protein contributes to viral pathogenesis by inhibiting host cell transcription and consequently the innate antiviral response (9–13). The role of SBV NSs as a virulence factor has been investigated using an NSs deletion mutant (SBV Δ NSs) produced by reverse genetics. In NIH-Swiss mice inoculated by intracerebral route, SBV Δ NSs showed an attenuated phenotype characterized by a delay in the time of death in comparison to wild-type (WT) SBV (7). This shows that SBV NSs plays a major role in viral pathogenesis. SBV Δ NSs, in contrast to its wild-type counterpart, is able to induce the synthesis of interferon (IFN) in several cell lines, demonstrating that SBV NSs inhibits the host IFN response (7, 14). Interestingly, SBV NSs is also able to trigger the proteasomal degradation of the Rpb1 subunit of RNA polymerase II (Pol II) *in vitro* and subsequently to inhibit cellular transcription and protein synthesis. The blockade of the IFN response by NSs may be a consequence of this global inhibition of transcription (15). Besides, a transcriptomic study has shown *in vitro* that SBV NSs causes a shutdown in the expression of genes involved in innate immunity. Nevertheless, this shutdown is incomplete since a few antiviral genes are still expressed following SBV infection (16). In addition, Barry et al. showed that SBV NSs could enhance the rate of apoptotic cell death (15).

In the present study, we identified a nucleolar localization signal (NoLS) between amino acids 33 and 51 (designated “aa 33–51” here) of SBV NSs that allows its colocalization with naturally resident nucleolar proteins, such as B23 (nucleophosmin) and fibrillarin. Most importantly, wild-type SBV induces nucleolus-to-nucleoplasm re-localization of B23 in several cell systems, including primary human neural progenitor cells (hNPCs). In contrast, the distribution of this protein was unmodified in cells infected with a mutant virus expressing an NSs variant lacking NoLS (SBV Δ NoLS). We also show that an NSs Δ NoLS mutant protein could not inhibit a cytomegalovirus (CMV)-driven promoter activity in comparison to its wild-type counterpart. To our knowledge, this is the first characterization of nucleolar targeting of a NSs protein from bunyaviruses.

RESULTS

SBV NSs subcellular localization. The S segment of SBV encodes the nucleoprotein N and the nonstructural protein NSs (Fig. 1A). NSs is encoded by an open reading frame (ORF) between nucleotides 48 and 323 of the antigenomic RNA in position +1 with respect to the ORF encoding the nucleoprotein N. NSs is poorly detected in SBV-infected cells or in cells transiently transfected with NSs expression plasmids (15; this work). This lack of expression might be partially attributed to an intrinsically unstable nature of the protein, which often relies on the presence of disordered domains. Indeed, *in silico* analyses performed with the PONDR-FIT software predict several natively disordered regions along the primary amino acid sequence (Fig. 1B). Especially, the N- and C-terminal ends of the protein as well as a central domain encompassing aa 33–51 appeared highly disordered, suggesting that NSs is an intrinsically unstructured protein. In order to assess the respective contribution of the ordered/disordered predicted regions in NSs expression and function, we generated expression plasmids for NSs and NSs deletion mutants containing or not the disordered sequence from aa 33 to aa 51 (Fig. 1C). We also cloned the full-length nucleoprotein (N) ORF as a control. All of these constructs were expressed as enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion proteins, and their expression was assessed by Western blotting (WB) upon transfection of HEK 293T cells using an anti-EGFP antibody (Fig. 1D). Full-length EGFP-NSs was mostly undetectable, although a very faint band could be inconstantly observed in some experiments, while all other NSs mutants and the N protein were detected in variable amounts. Then we assessed the intracellular distribution of these constructs in HeLa cells (Fig. 1E). As expected, EGFP alone displayed a diffuse pattern

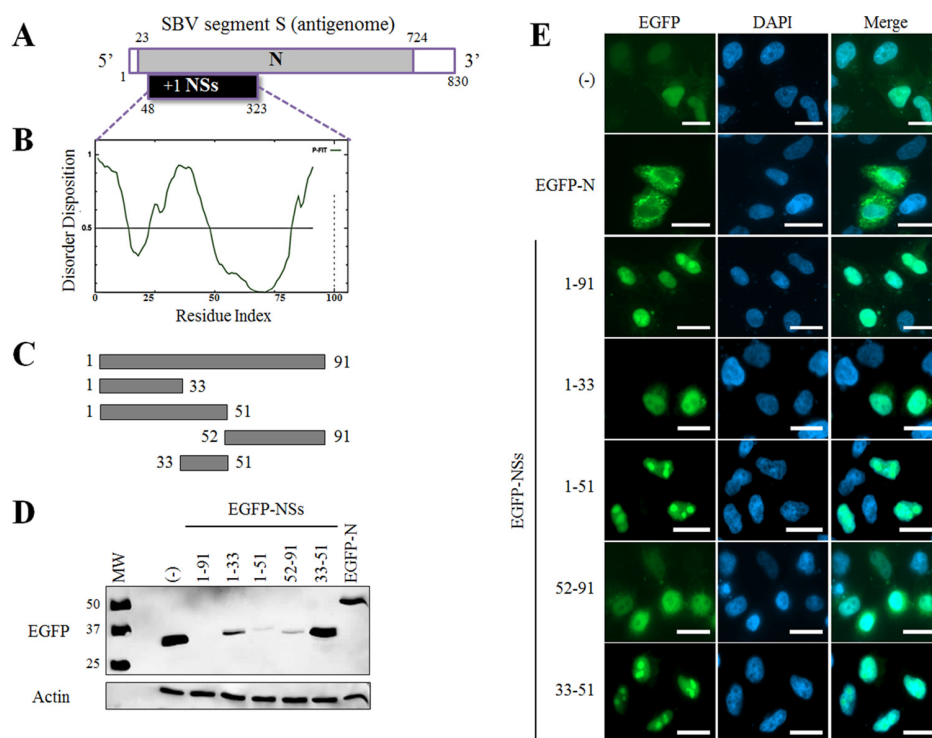


FIG 1 Expression and localization of SBV NSs mutants. (A) Schematic representation of SBV segment S (antigenomic sense). The 5' and 3' noncoding regions are indicated in white. The open reading frame (ORF) of the N protein is located between nucleotides 23 and 724. The NSs sequence is encoded by a +1 ORF between nucleotides 48 and 323. (B) Prediction of intrinsically disordered residues in SBV NSs using POND-R-FIT. The horizontal line at 0.5 of the y axis represents the threshold for disordered/structured residues. Residues with a score above this line are predicted to be disordered, and residues with a score below 0.5 are predicted to be ordered. (C) Schematic representation of NSs constructs used in panels D and E. (D) HEK 293T cells were transfected with 500 ng pEGFP-C1, pEGFP-N, or different pEGFP-NSs mutants as indicated. At 24 h posttransfection, cells were lysed, and lysates were used for detection of EGFP constructs by Western blot analysis. β -Actin was used as an internal control. (E) HeLa cells were transfected as in panel D. Twenty-four hours posttransfection, cells were fixed with 4% PFA and labeled with DAPI (blue) to stain nuclei. Intracellular localization of EGFP constructs (green) was visualized by fluorescence microscopy ($\times 63$ magnification). Scale bars represent 20 μ m.

throughout the cell, whereas EGFP-N mainly localized in the cytoplasm, as previously described (15). All NSs constructs, including the previously poorly detected full-length EGFP-NSs, were mostly present in the nucleus of transfected cells. Among those, EGFP-NSs(1–51) and EGFP-NSs(33–51) proteins were observed in specific dense punctate structures that were evocative of a nucleolar distribution. On the contrary, EGFP-NSs(1–33) and EGFP-NSs(52–91) constructs which do not contain the aa 33–51 disordered sequence are excluded from these subnuclear structures. Similar distribution patterns were found when an ovine cell line and a bovine cell line were analyzed (data not shown).

NSs contains a nucleolar localization signal (NoLS) and induces nucleolar disorganization. The atypical subnuclear localization of EGFP-NSs(33–51) prompted us to determine whether this chimeric protein was localized in nucleolar compartments. Thus, we carried out fluorescence microscopy in HeLa cells using the EGFP-NSs(33–51) construct and the nucleolus-resident proteins B23 and fibrillarin (Fig. 2A). EGFP-NSs(33–51) strongly colocalizes with both B23 and fibrillarin in transfected cells, indicating that this domain acts as a nucleolar targeting sequence. A similar distribution pattern was observed in ovine CPT-Tert cells and primary hNPCs (Fig. 2B). Then we searched for the presence of a nucleolar localization signal (NoLS) in the NSs protein using the web server NoD (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/nod>) (17). Although no NoLS was recognized within NSs sequence, the graphical output of the NoLS score revealed a peak (a value of 0.75) corresponding to a central region of the protein that almost reached

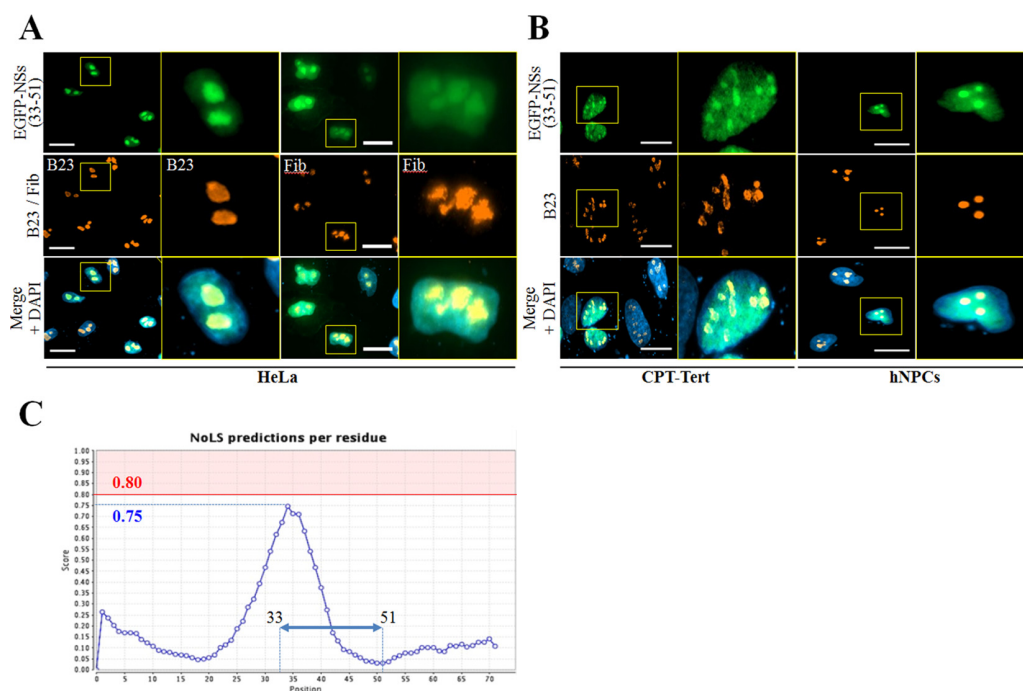


FIG 2 NSs contains a nucleolar targeting domain. (A and B) HeLa and CPT-Tert cells and hNPCs were transfected with 500 ng of pEGFP-NSs(33–51). At 24 h posttransfection, cells were fixed with 4% PFA and labeled with DAPI to stain nuclei and with specific antibodies for B23 and fibrillarin (Fib). Intracellular localization of DAPI-stained nuclei (blue), EGFP-NSs(33–51) (green), B23 and fibrillarin (red) was visualized by fluorescence microscopy ($\times 63$ magnification). One cell per picture was enlarged on the right side (yellow insets). Scale bars represent 20 μ m. (C) Graphic representation showing the average NoLS prediction score in the SBV NSs protein using NoD, a nucleolar localization sequence detector. The horizontal red line at value 0.8 of the y axis represents the threshold for NoLS prediction. Amino acid sequences with a score above this line are NoLS candidate segment regions and represent the range of scores within which a 20-residue segment is predicted to be an NoLS. The blue dotted line represents the score reached by SBV NSs, and the blue double-headed arrow indicates the aa 33–51 peptide localization.

the positive predictive value (i.e., values of ≥ 0.80 considered positive) (Fig. 2C). Interestingly, this region encompasses the aa 33–51 sequence that was seen in Fig. 1E and 2A and -B to display nucleolar localization. These data demonstrate that the aa 33–51 domain of SBV NSs contains a functional NoLS.

In order to assess whether the full-length NSs is also present in the nucleolus, fluorescence microscopy was performed in HeLa and CPT-Tert cells and primary hNPCs transfected with the pEGFP-NSs(1–91) plasmid (Fig. 3). The full-length EGFP-NSs was predominantly observed in the nucleus of all cell types as described in the legend to Fig. 1, but nucleolar localization was only partly recognized. Interestingly, B23 was largely redistributed from the nucleolus to the nucleoplasm in cells expressing EGFP-NSs. Altogether these results suggest that, once targeted to the nucleolus through an internal NoLS motif, full-length NSs protein provokes nucleolar disorganization.

SBV triggers nucleolar disruption at an early stage during infection. To better understand whether SBV perturbs nucleolus organization during infection, CPT-Tert cells, hNPCs, and HeLa cells were infected with SBV (multiplicity of infection [MOI] of 0.01). Then the viral N protein and the nucleolus-resident protein B23 were detected at 20 h postinfection (p.i.) by fluorescence microscopy (Fig. 4A). In all SBV-infected cell types, B23 was fully redistributed throughout the nucleoplasm, while in mock-infected and neighbor-uninfected cells, B23 displayed its typical nucleolar pattern. An alteration of B23 localization was also induced by Shamonda virus (SHAV), while B23 distribution pattern was unmodified in bluetongue virus (BTV)-infected cells, despite the fact the NS4 protein of this virus localizes in the nucleolus (Fig. 4B). This suggests a putative conserved mechanism between bunyavirus members of the Simbu serogroup.

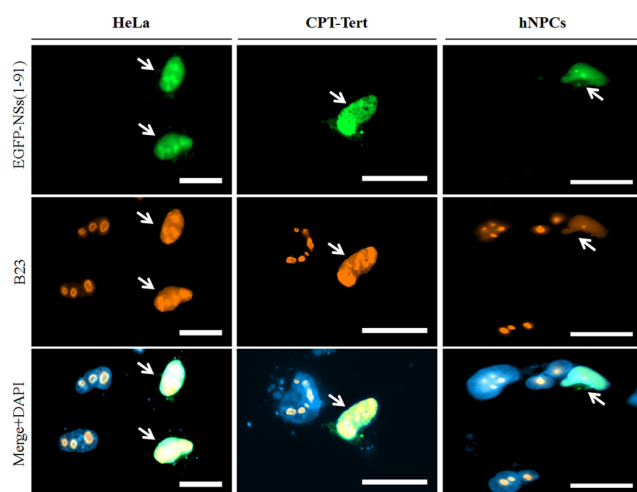


FIG 3 NSs triggers nucleolar reorganization. (A) HeLa and CPT-Tert cells and hNPCs were transfected with 500 ng of pEGFP-NSs(1–91). At 24 h posttransfection, cells were fixed with 4% PFA and labeled with DAPI to stain nuclei or stained with specific antibody for B23. Intracellular localization of DAPI-stained nuclei (blue), EGFP constructs (green), and B23 (red) was visualized by fluorescence microscopy ($\times 63$ magnification). Transfected cells are indicated using white arrows. Scale bars represent 20 μm .

To determine the timing of B23 redistribution during SBV infection, CPT-Tert cells were mock infected or infected with SBV (MOI of 0.1) and fixed at different times p.i. (Fig. 5). As soon as 4 h p.i., nucleolar distribution of B23 was already moderately altered and was completely redistributed in the nucleoplasm of SBV-infected cells at 12 h p.i. Similar results were found when an MOI of 0.5 was used (data not shown). These data strongly suggest that reorganization of the nucleolus occurs early during SBV infection.

SBV-induced nucleolar disorganization precedes Rpb1 degradation. It has been shown recently that transcription inhibition observed during SBV infection results from the proteasomal degradation of the Rpb1 subunit of RNA Pol II, which started from 6 h p.i. and was maximal at 15 h p.i. (15). As nucleolar disorganization occurs early during SBV infection, we wondered if this event can precede Rpb1 degradation. To address this hypothesis, the expression of Rpb1 as well as the nucleolar protein B23 was first measured by Western blot analysis at different times p.i. as described in the legend to Fig. 5. In SBV-infected CPT-Tert cells, the Rpb1 expression level started to decrease from 8 h to 12 h p.i. in comparison with that in mock-infected cells (Fig. 6A), which is in accordance with previously published data (15). In contrast, the steady-state protein level of B23 was unmodified at all considered time points p.i., suggesting that SBV infection alters localization of B23 but not its expression.

Then we studied Rpb1 localization in SBV-infected cells at similar times p.i. (Fig. 6B). As expected, Rpb1 was found in the nucleus of mock-infected cells. In SBV-infected cells, Rpb1 labeling started to decrease at 6 h p.i. and was poorly detected or not detected at the subsequent time points p.i. The low proportion of SBV-infected cells at 6 h p.i. could explain the lack of Rpb1 decrease at this time point as measured by Western blotting. Altogether these results indicate that nucleolar reorganization probably occurs a few hours before Rpb1 degradation during SBV infection.

Mutations in NoLS sequence impair NSs nucleolar localization. We next sought to identify the critical residues of the NSs(33–51) domain involved in nucleolar targeting. NoLS motifs are often enriched in basic residues (18). Interestingly, the NSs(33–51) domain contains two close stretches of basic residues: RRR(39–41) and RRH(48–50) (Fig. 7A). Thus, we aimed to assess the role of these positively charged residues in nucleolar targeting by replacing them by alanine residues. Either the first (NoLS 1), the second (NoLS 2), or both (NoLS 1+2) basic stretches were modified within the pEGFP-

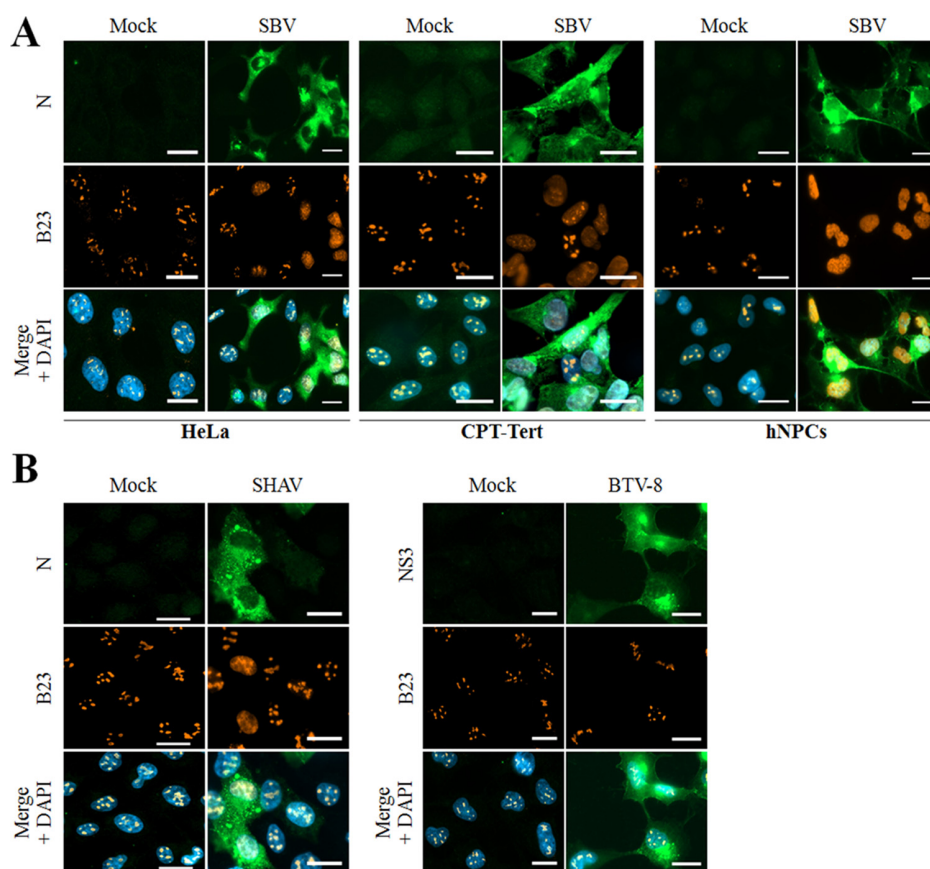


FIG 4 SBV and a Simbu-related virus trigger nucleolar reorganization during infection. (A) HeLa and CPT-Tert cells and hNPCs were mock infected or infected with the SBV WT (MOI of 0.01). After overnight incubation, cells were fixed with 4% PFA and labeled with DAPI to stain nuclei or stained with specific antibodies for B23 and SBV N. Intracellular localization of DAPI-stained nuclei (blue), B23 (red), and SBV N (green) was visualized by fluorescence microscopy ($\times 63$ magnification). Scale bars represent 20 μ m. (B) HeLa cells were mock infected or infected with either Shamonda virus (SHAV [left panel]) or bluetongue virus (BTV [right panel]). After overnight incubation, cells were fixed with 4% PFA and labeled with DAPI to stain nuclei or stained with specific antibodies for B23, N SHAV, or NS3 BTV-8. Intracellular localization of DAPI-stained nuclei (blue), B23 (red), and SHAV N or BTV NS3 (green) was visualized by fluorescence microscopy ($\times 63$ magnification). Scale bars represent 20 μ m.

NSs(1–91) plasmid construct. Cells transfected with either NoLS 1 or NoLS 2 mutants showed a predominant nuclear distribution with no or poor nucleolar localization, while the distribution of B23 appeared unaffected (Fig. 7B). Interestingly, the double NoLS 1+2 mutant displayed nuclear distribution, but nucleolar localization was completely abolished, suggesting that both positively charged sites are important for nucleolar targeting. These observations correlate with *in silico* analyses in which mutations of both basic stretches appeared to be required to fully impair NoLS prediction (<0.15) (Fig. 7B, right).

In order to specifically address the importance of NSs-induced nucleolar disorganization in virus replication cycle, we aimed to produce a recombinant virus expressing an NSs protein unable to reach the cell nucleolus. As N and NSs ORFs overlap on the S segment, nucleotide changes introduced in the NSs ORF could have a detrimental impact on N function and consequently on SBV replication. Computational predictions suggested that the last two residues of NoLS 1 and the first two residues of NoLS 2 were the most critical residues for nucleolar targeting. Based on this assumption, we designed an NSs mutant with predicted impaired nucleolar localization and low impact on N ORF (Fig. 7C). We replaced RR residues in positions 41 and 42 (NoLS 1) with GG residues and the RR residues in positions 48 and 49 (NoLS 2) with SL residues. While these substitutions created three nonsynonymous mutations in the N ORF (R48K, R49K,

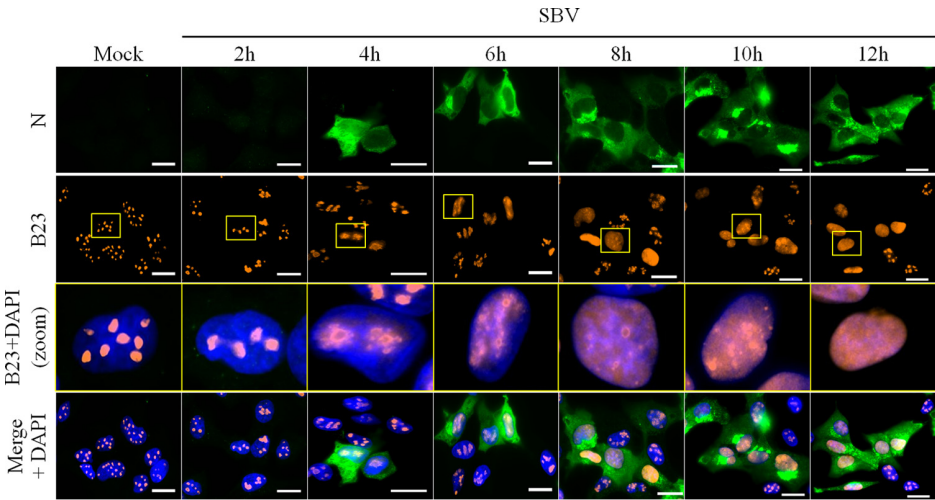


FIG 5 SBV-induced nucleolar reorganization occurs early during infection. CPT-Tert cells were infected with SBV WT (MOI of 0.1). At different time points p.i. (from 2 h to 12 h), cells were fixed with 4% PFA to study the subcellular localization of B23 and SBV N by fluorescence microscopy. After fixation, cells were labeled with DAPI to stain nuclei and stained with specific antibodies for B23 and SBV N. Intracellular localization of DAPI-stained nuclei (blue), B23 (red), and SBV N (green) was visualized by fluorescence microscopy ($\times 63$ magnification). One cell per picture was enlarged (yellow insets) to better assess gradual B23 relocation. Scale bars represent 20 μ m.

and T57S), the global charges and properties of the modified residues were preserved. Site-directed mutagenesis was used to introduce these mutations within pEGFP-NSs(1–91) to generate an EGFP-NSs(Δ NoLS) mutant. Fluorescence microscopy was then used to study the subcellular localization of EGFP-NSs(Δ NoLS) (Fig. 7B, lower panel). As predicted, EGFP-NSs(Δ NoLS) was found in the nucleus but not in the nucleolus, hence validating the suppression of NSs NoLS function.

An SBV mutant lacking NoLS is impaired in nucleolar disruption. We then generated a mutant virus, rSBV Δ NoLS, harboring these mutations by reverse genetics. We also rescued a wild-type SBV (rSBV WT) and rSBV Δ NSs, an SBV recombinant mutant virus lacking the entire NSs protein. rSBV Δ NoLS displayed the same replication kinetics

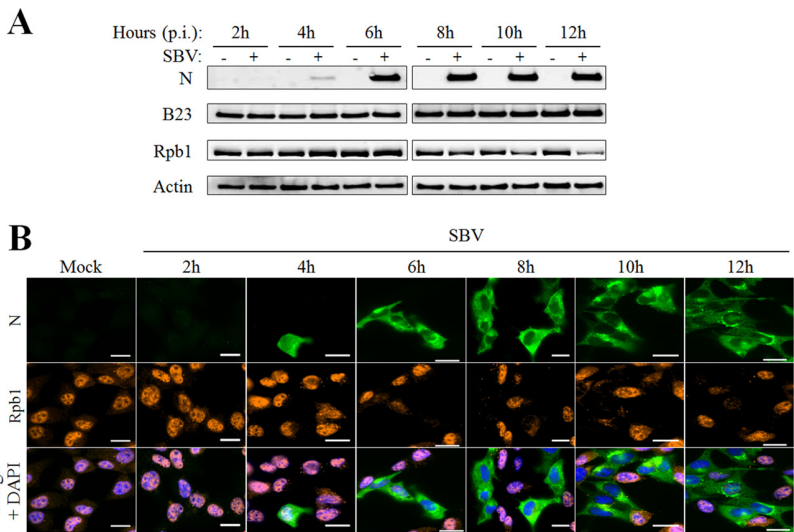


FIG 6 SBV-induced nucleolar reorganization occurs earlier than Rpb1 degradation. (A and B) CPT-Tert cells were infected with the SBV WT (MOI of 0.1). At different time points p.i. (from 2 h to 12 h), cells were either lysed for B23, Rpb1, SBV N and β -actin detection by Western blot analysis (A) or fixed with 4% PFA and subsequently labeled with DAPI to stain nuclei (blue) and stained with specific antibodies for Rpb1 (red) and SBV N (green). Scale bars represent 20 μ m (B).

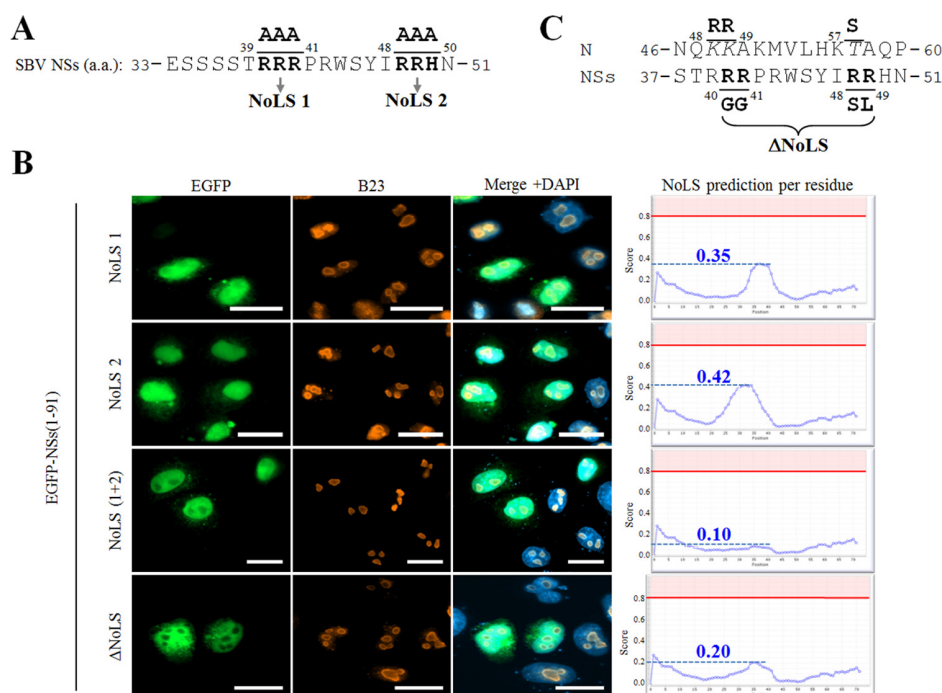


FIG 7 Mutation of a putative nucleolar localization signal impairs NSs nucleolar localization. (A) Amino acid sequence of the aa 33–51 region of SBV NSs. Bipartite triplet of basic residues corresponding to putative NoLS are depicted in bold type and termed NoLS 1 and NoLS 2. (B) HeLa cells were transfected with pEGFP-NSs(1–91) constructs mutated in NoLS 1, NoLS 2, both NoLS 1 and 2, and ΔNoLS as indicated. At 24 h posttransfection, cells were fixed with 4% PFA and labeled with DAPI to stain nuclei or stained with specific antibody for B23. Intracellular localizations of EGFP constructs (green), DAPI-stained nuclei (blue), and B23 (red) were visualized by fluorescence microscopy ($\times 63$ magnification). Scale bars represent 20 μ m. Each corresponding NoD graphic (right) shows the average NoLS prediction score in the mutated SBV NSs protein. The horizontal red line at value 0.8 of the y axis represents the threshold for NoLS prediction, and the blue dotted line represents the score reached by mutated SBV NSs. (C) Amino acid sequence of the aa 37–51 region of NSs and aa 46–60 region of N. Minimal NoLS mutations designed to be introduced in a recombinant virus were termed ΔNoLS and are depicted in bold type under the NSs sequence. Modified amino acids in NSs sequence appear in bold type, and consecutive changes in N sequence are represented in italic above the NSs sequence.

and reached the same titers as rSBV WT and rSBVΔNSs in IFN-deficient CPT-Tert cells (Fig. 8A).

Then the rSBVΔNoLS mutant was used to assess the impact of NSs localization on nucleolar organization during SBV infection. HeLa and CPT-Tert cells and hNPCs were mock infected or infected with rSBV WT, rSBVΔNSs, or rSBVΔNoLS (MOI of 0.01) (Fig. 8B to D). Cells were fixed at 18 h p.i., and B23 was detected by fluorescence microscopy. In mock-infected cells, B23 displayed a typical nucleolar pattern. In all cell types infected with rSBV WT, B23 was strongly redistributed throughout the nucleoplasm, while it was unchanged in neighbor-uninfected cells. However, we did not observe any redistribution of B23 in both rSBVΔNSs- and rSBVΔNoLS-infected-cells. Thus these data demonstrate that NSs impairs the B23 natural distribution during SBV infection and NSs nucleolar localization is necessary for this event.

NSs-induced transcriptional shutoff activity is hampered with ΔNoLS mutants.

It has recently been shown that SBV NSs inhibits IFN synthesis, and as a consequence, an SBV recombinant virus lacking NSs is attenuated *in vivo* (7, 19). Moreover, Barry et al. found that NSs is able to block global cellular synthesis, including the antiviral response (15). To assess the role of nucleolar localization in the ability of SBV NSs to interfere with gene expression, HEK 293T cells were mock infected or infected with rSBV, rSBVΔNSs, or rSBVΔNoLS (MOI of 0.1) and transfected with a plasmid expressing firefly luciferase under the control of the CMV promoter, pCMV-Luc(Firefly). Luciferase activity was measured 24 h later (Fig. 9A). As expected, luciferase activity was strongly

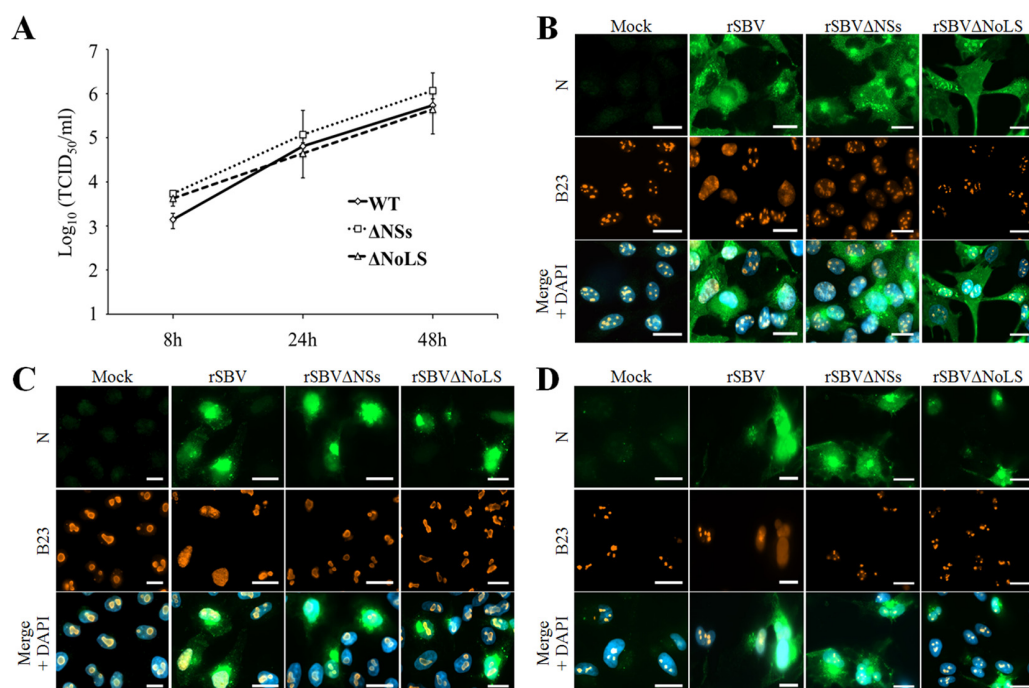


FIG 8 A SBVΔNoLS mutant virus does not induce nucleolar reorganization. (A) Replication kinetics of rSBV WT, rSBVΔNSs, and rSBVΔNoLS was assessed in CPT-Tert cells (MOI of 0.1). After infection, cell supernatants were collected from 8 h to 48 h p.i. and the viral titers were obtained by limiting dilution assays in CPT-Tert cells. Each experiment was performed in triplicate, and bars indicate the standard errors. (B to D) CPT-Tert cells (B), HeLa cells (C), and hNPCs (D) were mock infected or infected with rSBV WT, rSBVΔNSs, and rSBVΔNoLS (MOI of 0.01). After 24 h of infection, cells were fixed with 4% PFA and labeled with DAPI to stain nuclei or stained with specific antibody for B23. Intracellular localization of DAPI-stained nuclei (blue), B23 (red), and SBV N (green) was visualized by fluorescence microscopy ($\times 63$ magnification). Scale bars represent 20 μ m.

inhibited in rSBV-infected cells (>90% inhibition) compared to mock-infected cells. In contrast, luciferase activity was partly restored in cells infected with rSBVΔNoLS (49% inhibition) and to a lesser extent with rSBVΔNSs (74% inhibition). This suggests that the NSs nucleolar localization is also needed to counteract RNA Pol II-driven cellular

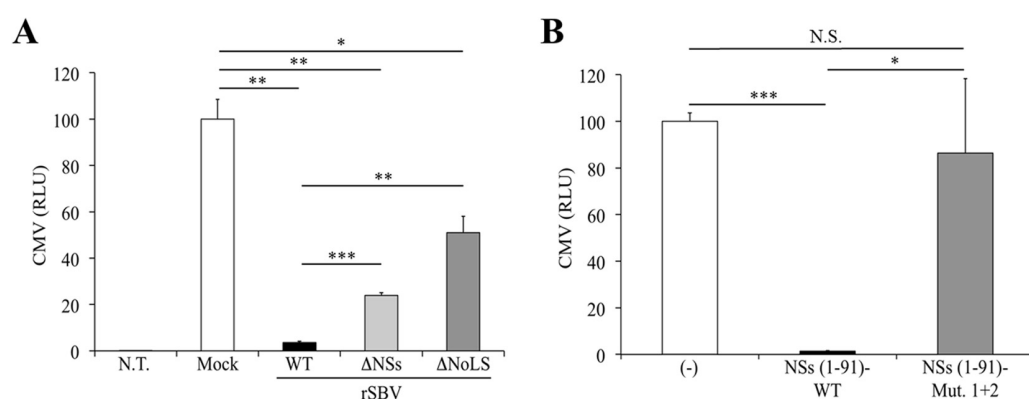


FIG 9 Involvement of the NoLS motif in NSs-induced cellular shutoff. (A) HEK 293T cells were not transfected (N.T.) or were transfected with 100 ng of pCMV-Luc(Firefly) reporter plasmid. After overnight incubation, cells were mock infected or infected with rSBV, rSBVΔNSs, or rSBVΔNoLS. Cell lysates were harvested 24 h p.i. and used to determine luciferase activities. Mean ratios of activities of triplicate samples were calculated and are presented as percentages of the mock control (\pm standard deviations). (B) HEK 293T cells were transfected with 250 ng of empty plasmid (-) or a plasmid encoding the 3 \times FLAG-NSs WT or NoLS 1+2 mutant together with 100 ng of the luciferase reporter plasmid pCMV-Luc(Firefly). Cell lysates were harvested 24 h after transfection and used to determine luciferase activities. Mean ratios of activities of triplicate samples were calculated and are presented as percentages of the control (\pm standard deviations). Results are representative of one experiment and were reproduced in three independent experiments. Statistically significant differences are indicated: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, and ***, $P < 0.001$, by Student's t test. N.S., not significant.

transcription. Moreover, Rpb1 as well as cellular RNA levels were unmodified in rSBVΔNoLS-infected cells (data not shown). Then a similar experimental approach was used to assess the effect of an NSs NoLS mutant on gene expression. We transfected HEK 293T cells with pCMV-Luc(Firefly) and plasmids encoding WT NSs or mutant NoLS 1+2 (Fig. 9B). As expected, the NSs(1–91) WT drastically repressed the activation of the firefly luciferase gene expression driven by the CMV promoter. In contrast, luciferase activity was fully restored in cells transfected with the NSs NoLS 1+2 mutant. Collectively, these results suggest that gene expression shutoff exerted by SBV NSs might require its proper localization to the nucleolus.

DISCUSSION

The NSs protein is a well-documented virulence factor within the *Bunyaviridae* that interferes with the cellular antiviral responses at the transcriptional level to facilitate viral replication and propagation. In particular, the Rpb1 subunit of RNA Pol II polymerase is targeted by several orthobunyaviruses, including the recently emerged SBV (9, 15, 20–22). In this study, we found that the NSs protein of SBV contains a nucleolar localization signal (NoLS) that is important for NSs function and disturbs the normal distribution of nucleolus-resident proteins. While it is well known that the majority of NSs proteins of bunyaviruses are nuclear proteins, to our knowledge, this is the first report of the presence of an NoLS within an NSs protein.

Until recently, the nucleolus was considered a subnuclear structure responsible for rRNA synthesis and nascent ribosome assembly. Several proteomic studies have shown that more than 6,000 resident or transitory proteins traffic through the nucleolus. The nucleolus is highly dynamic and plays fundamental roles in cellular stress responses, innate immune responses, or cell cycle regulation (reviewed in reference 23). Given the variety of key functions ensured by the nucleolus, many viruses that replicate in the nucleus (DNA viruses, retroviruses, and some negative-stranded RNA viruses) have usurped the nucleolus to favor their own replication (24–27). There are now many examples of viral proteins targeting the nucleolus, but the molecular function behind this localization is often uncertain or unresolved.

Most of the nucleolar proteins contain basic residue-rich sequences that act as nucleolar localization signals (NoLSs), although a consensus NoLS motif(s) has not been clearly defined. This is possibly due to the huge range of interactors involved in nucleolar localization. In this study, we found that the NSs region between amino acid residues 33 and 51 of NSs specifically targets this protein to the nucleolus and therefore acts as an NoLS. Fine dissection of this NoLS sequence allowed us to show that two stretches of basic residues are crucial for nucleolar targeting. Nucleolar localization of a protein is often governed by its association with another nucleolus-resident protein. Alternatively, the protein can traffic to the nucleolus on its own, where it associates with protein(s) and/or ribosomal DNA (rDNA)/rRNA to be retained in this compartment. NoLSs are often intimately associated with nuclear localization signals (NLSs) that are also enriched in basic residues and mediate active transport of proteins through the nuclear pore complex (28). We now aim to decipher the sequences involved in the nuclear import of NSs. We believe that NSs could traffic actively between the cytoplasm and the nucleus, while the NoLS functions more as a retention signal (unpublished data).

In our study, we found that SBV infection or NSs overexpression triggered the redistribution of B23 throughout the nucleoplasm. On the other hand, NoLS mutation in SBV NSs impaired NSs-induced transcription shutdown. These results raise the question about the link between nucleolar localization of NSs and transcription inhibition. Among the multiple strategies evolved by viruses to interfere with the host transcription machinery (29), nucleolar targeting is a common mechanism shared by several picornaviruses (24, 30). Indeed, the 3C^{pro} protease of poliovirus blocks RNA Pol I synthesis through modification and inactivation of factors essential for rRNA transcription, upstream binding factor (UBF) and selectivity factor 1 (SL1) possibly involving its proteolytic activity (31). The encephalomyocarditis virus encodes several proteins

(2A, 3B^{VPg}, 3C^{pro}, and 3D^{pol}) that also localize to the nucleolus at an early stage during infection (32). Although elucidation of the precise molecular mechanisms of the shutdown of cellular transcription by picornaviruses awaits further research, the nucleolus is clearly a primary interface in this process. In parallel, several studies showed that transcription inhibition can induce nucleolar disruption (reviewed in reference 33). Here, we found that nucleolar reorganization observed during SBV infection might occur slightly before Rpb1 degradation. However, we cannot rule out the possibility that RNA polymerase II activity might be blocked at an earlier time point. Thus, although the data presented in this article clearly show the requirement of an intact NoLS motif on NSs to ensure its intact subcellular localization and inhibitory function on RNA synthesis, further experiments are needed to decipher the exact molecular mechanisms involved in these events.

To date, only two other viral proteins have been reported to trigger Rpb1 degradation during infection: the NSs protein of the SBV-related orthobunyavirus La Crosse virus (LACV) (9) and the NSP2 protein of alphaviruses (34). This degradation seems to be linked to the blockade of cellular antiviral responses described for these proteins (9, 12, 35). Strikingly, the NSP2 protein encoded by the alphavirus Semliki Forest virus (SFV) is targeted to the nucleolus (36). Although the NoLS of SBV NSs is not fully conserved with LACV NSs, it would be interesting to assess whether the latter could also be addressed to the nucleolus through a specific sequence.

In an attempt to identify determinants of SBV virulence, Varela et al. serially performed extensive passage and plaque purification of SBV in CPT-Tert cells. They unexpectedly obtained an SBV mutant (SBVp32) with increased pathogenicity upon inoculation to newborn NIH-Swiss mice intracerebrally (7). SBVp32 accumulated 17 nucleotide changes among the three genome segments, with most of mutations identified within the M and S segments. By *in vivo* assays, they recently found that the M segment contains the determinants of virulence of SBVp32. In contrast, a reassortant containing the S segment of SBVp32 and the remaining genome segments from the SBV wild type is attenuated *in vivo*. Importantly, this naturally attenuated mutant harbors a nonsynonymous change at nucleotide 167, which induces a mutation in the first basic stretch of the NoLS motif, which is critical for nucleolar localization of NSs (37). The role of this natural *in vitro*-occurring mutation in SBV virulence has not specifically been addressed, but it underlines the importance of the NSs NoLS sequence in the SBV life cycle. Preliminary data suggest that the replication of the rSBVΔNoLS recombinant virus is impaired in IFN-competent cells, as previously observed with an SBVΔNSs mutant (7, 15), especially at late time points (data not shown). Thus, further work will be required to precise role of the NSs NoLS motif in the cellular antiviral response and in SBV attenuation.

Among the wide range of lesions that have been reported in SBV-infected fetuses and newborns, the central nervous system (CNS) constitutes a privileged target (7, 38–41). Indeed, loss of neural cells, and especially progenitor cells that give rise to precursors of neuronal and glial cell populations, is suspected to play a major role in SBV pathogenesis in domestic ruminants (E. Laloy, unpublished data). Whether cell loss either results from a direct SBV-driven cytopathic effect or is the consequence of an ischemic/inflammatory response requires further investigations. However, the presence of SBV antigens in neurons of associated lesions is in favor of the former hypothesis (7, 38, 39). Similarly Akabane virus is able to infect neuronal and astroglial cells, which led to degenerative death (42). In this study, we were able to demonstrate that SBV replicates efficiently in a model of primary human neural progenitor cells (hNPCs) and that NSs is highly efficient in these cells to relocate nucleolar proteins. It is interesting to note that recent findings point toward novel functions of the nucleolus in neuronal disorders (43, 44). This strengthens the putative link between NSs-triggered nucleolar alteration and SBV pathogenesis.

In conclusion, the present article clearly shows that the NSs protein of SBV is targeted to the nucleolus by an NoLS identified in the central region of the protein. The presence of NSs in the nucleolar compartment causes a nucleolar stress pointed out by

the relocalization of nucleolar proteins. We cannot rule out that NSs possesses other biological functions outside the nucleolus, but we think that nucleolar stress is the main driver for NSs to prompt transcriptional shutoff and, therefore, provide the molecular basis explaining the role of SBV NSs as a virulence factor.

MATERIALS AND METHODS

Cells. HeLa cells (kindly provided by Damien Arnoult, Inserm U1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France), HEK 293T cells, Vero cells (kindly provided by Pierre-Olivier Vidalain, UMR8601, CNRS-Université Paris-Descartes, Paris, France), and BSR-T7/5 cells (kindly provided by Jean-François Eleouët, INRA VIM, Jouy-en-Josas, France) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM [Gibco]) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS [Eurobio]), and 1% sodium pyruvate with 100 IU/ml penicillin plus 100 µg/ml streptomycin (P-S [Gibco]). BSR T7/5 cells stably expressing the T7 polymerase were cultured in the presence of G418 (final concentration of 50 µg/ml) every five passages to maintain T7 expression. BHK-21 cells (kindly provided by the National Reference Laboratory for Orbiviruses, Laboratory for Animal Health, ANSES, Maisons-Alfort, France) were grown in Glasgow MEM (GMEM [Sigma-Aldrich]) supplemented with tryptose phosphate broth, 10% FCS, and P-S. The ovine CPT-Tert cell line (kindly provided by David Griffiths, Moredun Research Institute, Penicuik, UK) derives from choroid plexus cells (45) and was grown in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM [Sigma-Aldrich]) supplemented with 10% FCS, 1% sodium pyruvate, 1 mM nonessential amino acids, and P-S. Human neural progenitor cell cultures (hNPCs) were prepared from human fetal brains (first trimester stage [see references 46 and 47 for details]). hNPCs were maintained in advanced DMEM-F-12 (Invitrogen Life Technologies) supplemented with L-glutamine (2 mM [Gibco]), apotransferrin (0.1 mg/ml [Sigma-Aldrich]), insulin (25 µg/ml [Sigma-Aldrich]), and progesterone (6.3 ng/ml [Sigma-Aldrich]). Medium was changed 3 times a week, and epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor (both at 20 ng/ml [Abcys]) were added to maintain undifferentiated cells. All cells were cultured at 37°C in 95% air–5% CO₂.

Viruses and infections. The wild-type SBV viral strain was isolated from the brain of a stillborn malformed lamb in the department of Moselle in France in 2012 (UMR1161 Virology Collection, ANSES, Maisons-Alfort, France). Virus titers were determined by standard plaque assays or endpoint dilution in CPT-Tert cells and expressed as PFU per milliliter or 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) per milliliter. Shamonda virus (SHAV) was kindly provided by Philippe Despres (Institut Pasteur, France). The wild-type field strain of bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) was isolated in the department of Ardennes in 2006 (48). Infections were performed with subconfluent HeLa and CPT-Tert cells or hNPCs. Cells were washed in serum-free medium and then inoculated with the viral inoculum at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 or 0.1/cell diluted in serum-free medium. Serum-free medium was used as an inoculum for mock-infected cells. After 1 h of incubation at 37°C while stirring, the inoculum was discarded, and fresh medium supplemented with 10% FCS was added to cell cultures. After infection, cells were analyzed at the indicated time points by fluorescence microscopy or Western blotting.

Plasmids. DNA sequences containing full-length open reading frames (ORFs) of SBV N, NSs(1–91), or NSs deletion mutants corresponding to aa 1 to 33, 1 to 51, 52 to 91, or 33 to 51 were amplified by PCR and cloned by *in vitro* recombination into pDONR207 (Gateway system; Invitrogen) as described in references 49 and 50). These SBV coding sequences were subsequently recombined into the pEGFP-C1 or pCINeo-3×FLAG modified vectors using the Gateway cloning procedure to generate fusion proteins downstream of EGFP (pEGFP-N/NSs constructs) or 3×FLAG (pF-NSs constructs), respectively (50). NoLS mutants on NSs full-length plasmid constructs were generated by site-directed mutagenesis following the manufacturer's instructions (QuikChange II site-directed mutagenesis [Agilent]). The pCMV-Luc(Firefly) luciferase reporter plasmid was kindly provided by Frédéric Arnaud (UMR754 INRA-UCBL-EPHE). The pUCSBVST7, pUCSBVMT7, pUCSBVLT7, and pUCSBVΔNSsT7 plasmids encoding antigenomic viral S, M, L, and ΔNSs segments, respectively, were used to generate recombinant wild-type (rSBV) and ΔNSs (rSBVΔNSs) viruses as described in reference 7. pUCSBVΔNoLST7 was obtained by introducing 4 codon changes in pUCSBVST7 by site-directed mutagenesis to abolish the NSs nucleolar localization signal (Fig. 7).

Transfections. All transfections were performed with JetPRIME (Polyplus) according to the manufacturer's instructions.

Reverse genetics. The recombinant rSBV WT, rSBVΔNSs, and rSBVΔNoLS viruses were generated using the SBV reverse-genetics protocols described in reference 7. Briefly, BSR-T7/5 cells were transfected with 750 µg of each plasmid carrying the antigenome. Supernatants were collected 5 days posttransfection, and the titers of the rescued viruses were determined by plaque assays in CPT-Tert cells.

Virus replication kinetics. To assess the replication kinetics of recombinant SBV viruses, 24-well plates were seeded with 1×10^5 CPT-Tert cells/well, and the cells were infected at an MOI of 0.01. Cell supernatants were collected at several time points postinfection (p.i.) and used to estimate the presence of infectious viral particles by endpoint dilution performed in CPT-Tert cells.

Computational analyses. PONDR-FIT, a meta-predictor of intrinsically disordered residues, was used to predict the disordered region(s) in the NSs amino acid sequence (available at www.disprot.org) (51). Prediction of nucleolar localization sequences was performed using the web server NoD (available at: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/>) (17).

Antibodies. SBV infection was detected using a rabbit polyclonal antiserum raised against the SBV N protein expressed as a His-tagged recombinant protein from baculovirus in insect cell line Sf9 (Western blotting [WB], 1:1,000; immunofluorescence [IF], 1:500) (UMR1161 Virology, ANSES, Maisons-Alfort,

France). N and NSs proteins expressed in fusion downstream of EGFP were detected using mouse monoclonal anti-GFP antibody (Roche Life Science; reference no. 11814460001 [WB, 1:2,000]). Monoclonal anti-B23 (reference no. B0556 [WB, 1:10,000; IF, 1:1,000]) and antiactin (clone AC-40; reference no. A3853 [WB 1:2,500]) antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. Mouse monoclonal antibody against fibrillarin used in this study was from Abcam (IF, 1:250). Mouse anti-Rpb1 monoclonal antibody was purchased from Ozyme (clone 8WG16; reference no. BLE92010 [WB, 1:500; IF, 1:250]).

Luciferase reporter assays. The effect of NoLS mutations on NSs-driven inhibition of gene expression was assessed using luciferase reporter assays. Briefly, 7×10^5 HEK 293T cells were transfected with 250 ng of empty plasmid (–) or plasmids encoding 3×FLAG-NSs WT or the NoLS 1+2 mutant together with 100 ng of the luciferase reporter plasmid pCMV-Luc(Firefly). Cells were incubated for 24 h and then lysed in luciferase lysis buffer (25 mM Tris [pH 7.8], 0.8 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 15% glycerol). Firefly luciferase activity was determined using the Bright-Glo luciferase assay system (Promega). Each experiment was performed in triplicate at least three times independently. Mean ratios of activities of triplicate samples were calculated and presented as percentages of the control (\pm standard deviations). To assess the effect of SBV mutant viruses on the CMV promoter, 24-well plates were seeded with 7×10^5 HEK 293T cells, and the cells were mock infected or infected with rSBV WT, SBVΔNSs, and SBVΔNoLS (MOI of 0.1). Immediately after infection, cells were transfected with 100 ng of pCMV-Luc(Firefly) and analyzed as described above.

Immunofluorescence assays. Twelve-millimeter-diameter coverslips in 24-well plates were seeded with CPT-Tert (2×10^5) or HeLa (1×10^5) cells. Twenty-four-well glass plates (Ibidi μ -plates, BioValley) precoated with Matrigel (1:1,000 [Corning, France]) were directly seeded with hNPCs (1×10^5). After transfection and/or infection, cells were washed 3 times in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA [Electron Microscopy Sciences]) in PBS for 20 min at room temperature. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS and incubated in blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS). The appropriate dilution of primary antibodies was then added for 1 h at room temperature. Cells were then washed three times in PBS, and Alexa Fluor 488 anti-mouse and Alexa Fluor 555 anti-rabbit secondary antibodies (Molecular Probes) were used to detect bound primary antibodies. Samples were mounted in Mowiol containing DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole) for staining of nuclei (Sigma-Aldrich). Microscopy studies were carried out with an Axio observer Z1 fluorescence inverted microscope (Zeiss), and images were acquired using the Zen 2012 software and analyzed with ImageJ. Each experiment was reproduced at least 3 times.

Western blot analysis. Cells were harvested in lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and 10% glycerol supplemented with a cocktail of protease inhibitors according to the manufacturer's instructions [Complete EDTA-free [Roche Life Science]]). Insoluble material was centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min at 4°C, and the supernatant was kept as the soluble fraction. The total protein concentration of the soluble fraction was determined by a micro-bicinchoninic acid (micro-BCA) assay (Thermo Fisher). Protein extracts were reduced by being heated at 95°C for 5 min in the presence of denaturing agent, and an equal amount of proteins was resolved by 10% to 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), followed by transfer to nitrocellulose membrane (Hybond-ECL; Amersham Biosciences). Membranes were blocked with phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% dry milk and 0.1% Tween 20 and incubated with the required dilution of specific antibodies. Bound primary antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Dako [diluted 1:5,000]) and an enhanced luminol-based chemiluminescent detection system (ECL clarity; Bio-Rad).

Statistical analyses. Statistical analyses were conducted with the Student *t* test. Differences were considered to be significant if the *P* value was <0.05 .

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Eve Laloy, Virginie Doceul, and Houssam Attoui for fruitful discussions and readings of the manuscript and members of our laboratories for useful suggestions.

This study received funding from the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant no. ANR-10-LABX-62-IBEID). Julie Gouzil and Cindy Kundlacz were awarded a Ph.D. studentship by ANSES. Estelle Lara was awarded a postdoctoral fellowship by ANSES. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

- Hoffmann B, Scheuch M, Hoper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Beer M. 2012. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis* 18:469–472. <https://doi.org/10.3201/eid1803.111905>.
- Doceul V, Lara E, Saillieu C, Belbis G, Richardson J, Breard E, Viarouge C, Dominguez M, Hendrikx P, Calavas D, Desprat A, Languille J, Comtet L, Pourquier P, Eleouet JF, Delmas B, Marianneau P, Vitour D, Zientara S. 2013. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *Vet Res* 44:31. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-31>.
- Schnettler E, Ratnien M, Watson M, Shaw AE, McFarlane M, Varela M, Elliott RM, Palmarini M, Kohl A. 2012. RNA interference targets arbovirus replication in *Culicoides* cells. *J Virol* 87:2441–2454. <https://doi.org/10.1128/JVI.02848-12>.
- Rasmussen LD, Kristensen B, Kirkeby C, Rasmussen TB, Belsham GJ, Bodker R, Botner A. 2012. *Culicoides* as vectors of Schmallenberg virus.

- Emerg Infect Dis 18:1204–1206. <https://doi.org/10.3201/eid1807.120385>.
5. Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Kooi EA. 2013. Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis* 19:106–109. <https://doi.org/10.3201/eid1901.121054>.
 6. De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, Vantieghem P, Maddier M, Geysen D, Smeets F, Losson B, van den Berg T, Cay AB. 2012. Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis* 59:471–475. <https://doi.org/10.1111/tbed.12000>.
 7. Varela M, Schnettler E, Caporale M, Murgia C, Barry G, McFarlane M, McGregor P, Piras IM, Shaw A, Lamm C, Janowicz A, Beer M, Glass M, Herder V, Hahn K, Baumgartner W, Kohl A, Palmarini M. 2013. Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathog* 9:e1003133. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003133>.
 8. Beer M, Conraths FJ, van der Poel WH. 2013. ‘Schmallenberg virus’—a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol Infect* 141:1–8. <https://doi.org/10.1017/S0950268812002245>.
 9. Verbruggen P, Ruf M, Blakqori G, Overby AK, Heidemann M, Eick D, Weber F. 2011. Interferon antagonist NSs of La Crosse virus triggers a DNA damage response-like degradation of transcribing RNA polymerase II. *J Biol Chem* 286:3681–3692. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154799>.
 10. Weber F, Bridgen A, Fazakerley JK, Streitenfeld H, Kessler N, Randall RE, Elliott RM. 2002. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. *J Virol* 76:7949–7955. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.16.7949-7955.2002>.
 11. Habjan M, Pichlmair A, Elliott RM, Overby AK, Glatter T, Gstaiger M, Superti-Furga G, Unger H, Weber F. 2009. NSs protein of Rift Valley fever virus induces the specific degradation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol* 83:4365–4375. <https://doi.org/10.1128/JVI.02148-08>.
 12. Blakqori G, Delhaye S, Habjan M, Blair CD, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Attarzadeh-Yazdi G, Fragkoudis R, Kohl A, Kalinke U, Weiss S, Michiels T, Staeheli P, Weber F. 2007. La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts. *J Virol* 81:4991–4999. <https://doi.org/10.1128/JVI.01933-06>.
 13. Bridgen A, Weber F, Fazakerley JK, Elliott RM. 2001. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:664–669. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.664>.
 14. Kraatz F, Wernike K, Frachinger S, König P, Granzow H, Reimann I, Beer M. 2015. Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J Virol* 89:1825–1837. <https://doi.org/10.1128/JVI.02729-14>.
 15. Barry G, Varela M, Ratnien M, Blomstrom AL, Caporale M, Seehusen F, Hahn K, Schnettler E, Baumgartner W, Kohl A, Palmarini M. 2014. NSs protein of Schmallenberg virus counteracts the antiviral response of the cell by inhibiting its transcriptional machinery. *J Gen Virol* 95:1640–1646. <https://doi.org/10.1099/vir.0.065425-0>.
 16. Blomstrom AL, Gu Q, Barry G, Wilkie G, Skelton JK, Baird M, McFarlane M, Schnettler E, Elliott RM, Palmarini M, Kohl A. 2015. Transcriptome analysis reveals the host response to Schmallenberg virus in bovine cells and antagonistic effects of the NSs protein. *BMC Genomics* 16:324. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1538-9>.
 17. Scott MS, Troshin PV, Barton GJ. 2011. NoD: a nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics* 12:317. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-317>.
 18. Emmott E, Hiscox JA. 2009. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* 10:231–238. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.14>.
 19. Elliott RM, Blakqori G, van Knippenberg IC, Koudriakova E, Li P, McLees A, Shi X, Szemiel AM. 2013. Establishment of a reverse genetics system for Schmallenberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in Europe. *J Gen Virol* 94:851–859. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049981-0>.
 20. Thomas D, Blakqori G, Wagner V, Banholzer M, Kessler N, Elliott RM, Haller O, Weber F. 2004. Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem* 279:31471–31477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400938200>.
 21. van Knippenberg I, Carlton-Smith C, Elliott RM. 2010. The N-terminus of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein is essential for interferon antagonism. *J Gen Virol* 91:2002–2006. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021774-0>.
 22. Leonard VH, Kohl A, Hart TJ, Elliott RM. 2006. Interaction of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. *J Virol* 80:9667–9675. <https://doi.org/10.1128/JVI.00822-06>.
 23. Pederson T. 2011. The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a000638. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000638>.
 24. Rawlinson SM, Moseley GW. 2015. The nucleolar interface of RNA viruses. *Cell Microbiol* 17:1108–1120. <https://doi.org/10.1111/cmi.12465>.
 25. Hiscox JA. 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* 5:119–127. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1597>.
 26. Wang L, Ren XM, Xing JJ, Zheng AC. 2010. The nucleolus and viral infection. *Virol Sin* 25:151–157. <https://doi.org/10.1007/s12250-010-3093-5>.
 27. Salvetti A, Greco A. 2014. Viruses and the nucleolus: the fatal attraction. *Biochim Biophys Acta* 1842:840–847. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.010>.
 28. Cautain B, Hill R, de Pedro N, Link W. 2015. Components and regulation of nuclear transport processes. *FEBS J* 282:445–462. <https://doi.org/10.1111/febs.13163>.
 29. Lyles DS. 2000. Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:709–724. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.709-724.2000>.
 30. Chase AJ, Semler BL. 2012. Viral subversion of host functions for picornavirus translation and RNA replication. *Future Virol* 7:179–191. <https://doi.org/10.2217/fvl.12.2>.
 31. Banerjee R, Weidman MK, Navarro S, Comai L, Dasgupta A. 2005. Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase II transcription. *J Gen Virol* 86:2315–2322. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80817-0>.
 32. Aminev AG, Amineva SP, Palmenberg AC. 2003. Encephalomyocarditis virus (EMCV) proteins 2A and 3BCD localize to nuclei and inhibit cellular mRNA transcription but not rRNA transcription. *Virus Res* 95:59–73. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00163-1).
 33. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. 2010. The nucleolus under stress. *Mol Cell* 40:216–227. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.024>.
 34. Akhrymuk I, Kulemzin SV, Frolova EI. 2012. Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. *J Virol* 86:7180–7191. <https://doi.org/10.1128/JVI.00541-12>.
 35. Bourai M, Lucas-Hourani M, Gad HH, Drosten C, Jacob Y, Tafforeau L, Cassonnet P, Jones LM, Judith D, Couderc T, Lecuit M, Andre P, Kummer BM, Lotteau V, Despres P, Tangy F, Vidalain PO. 2012. Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *J Virol* 86:3121–3134. <https://doi.org/10.1128/JVI.06390-11>.
 36. Rikonen M, Peranen J, Kaariainen L. 1992. Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virol* 189:462–473. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90570-F](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90570-F).
 37. Varela M, Pinto RM, Caporale M, Piras IM, Taggart A, Seehusen F, Hahn K, Janowicz A, Marciel de Souza W, Baumgartner W, Shi X, Palmarini M. 2016. Mutations in the Schmallenberg virus Gc glycoprotein facilitate cellular protein synthesis shutoff and restore pathogenicity of NSs deletion mutants in mice. *J Virol* 90:5440–5450. <https://doi.org/10.1128/JVI.00424-16>.
 38. Hahn K, Habierski A, Herder V, Wohlsein P, Peters M, Hansmann F, Baumgartner W. 2013. Schmallenberg virus in central nervous system of ruminants. *Emerg Infect Dis* 19:154–155. <https://doi.org/10.3201/eid1901.120764>.
 39. Peperkamp K, Dijkman R, van Maanen C, Vos J, Wouda W, Holzhauser M, van Wuijkhuise L, Junker K, Greijdanus S, Roumen M. 2012. Polioencephalo-mylitis in a calf due to infection with Schmallenberg virus. *Vet Rec* 170:570. <https://doi.org/10.1136/vr.e3795>.
 40. Herder V, Hansmann F, Wohlsein P, Peters M, Varela M, Palmarini M, Baumgartner W. 2013. Immunophenotyping of inflammatory cells associated with Schmallenberg virus infection of the central nervous system of ruminants. *PLoS One* 8:e62939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062939>.
 41. Garigliany MM, Hoffmann B, Dive M, Sartelet A, Bayrou C, Cassart D, Beer M, Desmets D. 2012. Schmallenberg virus in calf born at term with porencephaly, Belgium. *Emerg Infect Dis* 18:1005–1006. <https://doi.org/10.3201/eid1806.120104>.
 42. Kitani H, Yamakawa M, Ikeda H. 2000. Preferential infection of neuronal and astroglia cells by Akabane virus in primary cultures of fetal bovine brain. *Vet Microbiol* 73:269–279. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00158-9).

43. Hetman M, Pietrzak M. 2012. Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends Neurosci* 35:305–314. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.002>.
44. Marquez-Lona EM, Tan Z, Schreiber SS. 2012. Nucleolar stress characterized by downregulation of nucleophosmin: a novel cause of neuronal degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 417:514–520. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.152>.
45. Arnaud F, Black SG, Murphy L, Griffiths DJ, Neil SJ, Spencer TE, Palmarini M. 2010. Interplay between ovine bone marrow stromal cell antigen 2/tetherin and endogenous retroviruses. *J Virol* 84:4415–4425. <https://doi.org/10.1128/JVI.00029-10>.
46. Brnic D, Stevanovic V, Cochet M, Agier C, Richardson J, Montero-Menei CN, Milhavet O, Eloit M, Culpier M. 2012. Borna disease virus infects human neural progenitor cells and impairs neurogenesis. *J Virol* 86:2512–2522. <https://doi.org/10.1128/JVI.05663-11>.
47. Scordel C, Huttin A, Cochet-Bernoin M, Szelechowski M, Poulet A, Richardson J, Benchoua A, Gonzalez-Dunia D, Eloit M, Culpier M. 2015. Borna disease virus phosphoprotein impairs the developmental program controlling neurogenesis and reduces human GABAergic neurogenesis. *PLoS Pathog* 11:e1004859. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004859>.
48. Doceul V, Chauveau E, Lara E, Breard E, Sailleau C, Zientara S, Vitour D. 2014. Dual modulation of type I interferon response by bluetongue virus. *J Virol* 88:10792–10802. <https://doi.org/10.1128/JVI.01235-14>.
49. Caignard G, Guerbois M, Labernardiere JL, Jacob Y, Jones LM, Wild F, Tangy F, Vidalain PO. 2007. Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN- α /beta signaling. *Virology* 368:351–362. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.037>.
50. 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. 2009. Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS. *J Biol Chem* 284:21797–21809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.018275>.
51. Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker AK, Uversky VN. 2010. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1804:996–1010. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.011>.

RESUME

Le virus de la fièvre catarrhale ovine (*Bluetongue virus*, BTV) est l'agent étiologique de la maladie du même nom, une arbovirose non contagieuse transmise aux ruminants domestiques et sauvages par l'intermédiaire de morsures de mouches hémaphysomes du genre *Culicoides*. Il existe actuellement 27 sérotypes décrits de BTV à travers le monde qui se distinguent par les pathologies qu'ils induisent et leur capacité à infecter et se propager chez leur(s) hôte(s) mammifère(s). Le premier objectif de mon projet de thèse visait à identifier les interactions cellulaires spécifiques des sérotypes 8 et 27 pour identifier des facteurs de pathogénicité/virulence et/ou de franchissement de barrière d'espèces. Pour atteindre cet objectif, l'ensemble des protéines virales du BTV a été criblé par la méthode du double-hybride en levure contre deux banques d'ADN complémentaires, l'une d'origine bovine et l'autre d'origine culicoïde. A l'issue de 70 cribles, une centaine de nouvelles interactions virus-hôtes a été mise en évidence et révèle un enrichissement pour quatre processus cellulaires : l'épissage des ARNm, les ribosomes, la SUMOylation et l'apoptose. Cette étude nous a ainsi permis de réaliser le premier interactome pour le BTV qui se poursuit au travers de multiples validations biochimiques et fonctionnelles des interactions identifiées. En parallèle de ce travail de protéomique, le second objectif de mon projet de thèse a été de déterminer l'impact du BTV sur la voie MAPK/ERK, une voie cellulaire essentielle à la prolifération et différenciation cellulaire et classiquement modulée lors d'infections virales. En plus de son rôle antagoniste sur la voie des interférons de type I, nous avons démontré la capacité de la protéine NS3 de BTV à activer la voie MAPK/ERK. En effet, nous avons démontré que NS3 a la capacité d'augmenter le niveau de phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 mais également du facteur de traduction eIF4E. Cette fonction, qui semble être spécifique au BTV par rapport aux autres orbivirus, implique l'interaction de NS3 avec la protéine cellulaire BRAF, une protéine MAP3 kinase jouant un rôle majeur dans l'activation de la voie MAPK/ERK. L'activation de cette voie par NS3 pourrait être un mécanisme de détournement de la traduction cellulaire au profit de celle du virus mais aussi constituer un élément de réponse pour expliquer l'hyper-inflammation observée dans le cas d'une infection par ce virus.

MOTS CLES : virus de la fièvre catarrhale ovine, interactions virus-hôtes, protéine NS3, voie MAPK/ERK

ABSTRACT

Bluetongue virus (BTV) is the etiological agent of the bluetongue (BT) disease, a non-contagious arbovirus that affects a wide range of wild and domestic ruminants. It is transmitted by blood-feeding midges of the genus *Culicoides*. There are currently 27 serotypes described of BTV in the world that are distinguished by their differences in term of pathology/virulence and their capacity to infect and disseminate in their mammalian host(s). The first objective of my thesis project was to identify specific cellular interactions of serotype 8 and 27 to reveal new factors of pathogenicity/virulence and/or cross species barrier. To reach this goal, all the proteins encoded by BTV were used as baits to screen, by a high-throughput yeast two-hybrid (Y2H) approach, two complementary DNA libraries originating from hosts naturally infected by BTV : *Culicoides* and cattle. Therefore, 70 screens were performed to identify a hundred of new virus-host interactions and reveal an enrichment for four cellular processes : mRNA splicing, ribosomes, SUMOylation and apoptosis. This study allowed us to build the first interactome of BTV which continues through multiple biochemical and functional validations of the identified interactions. In parallel to this proteomics work, my second objective was to determine the impact of BTV on the MAPK/ERK pathway, a cellular pathway essential for cell proliferation and differentiation usually modulated during viral infections. In addition to its antagonist role on the type I interferon pathway, we have demonstrated the ability of BTV-NS3 to activate the MAPK/ERK pathway. Indeed, we have demonstrated that NS3 has the ability to increase the level of phosphorylation of ERK1/2 protein and the eIF4E translation factor. This function, which seems to be specific to BTV compared to other orbiviruses, involves the interaction of NS3 with BRAF cellular protein, a MAP3 kinase protein that plays a major role in the regulation of the MAPK/ERK pathway. These results could provide a better understanding of the molecular basis underlying the hijacking of the translation machinery to support virus replication but also constitute a hypothesis to explain the hyperinflammation observed in the BTV infection context.

KEYWORDS : bluetongue virus, virus-host interactions, NS3 protein, MAPK/ERK signaling pathway