



HAL
open science

Rôle des protéines NS4 et NS5 du virus de la fièvre catarrhale ovine dans les mécanismes de pathogenèse et de transmission interspécifique

Aurore Fablet

► **To cite this version:**

Aurore Fablet. Rôle des protéines NS4 et NS5 du virus de la fièvre catarrhale ovine dans les mécanismes de pathogenèse et de transmission interspécifique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03906414

HAL Id: hal-03906414

<https://ephe.hal.science/hal-03906414>

Submitted on 19 Dec 2022

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.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

Aurore FABLET

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Rôle des protéines NS4 et NS5 du virus de la fièvre catarrhale ovine dans les mécanismes de pathogenèse et de transmission interspécifique

soutenu le 1^{er} décembre 2022 devant le jury suivant :

Dr Sophie GAD-LAPITEAU, Maître de conférences, EPHE – Présidente

Dr Damien VITOUR, Chargé de projet Virologie, ANSES – Tuteur scientifique

Dr Maxime RATINIER, Maître de conférences, EPHE – Tuteur pédagogique

Dr Sandie MUNIER, Maître de conférences, Institut Pasteur – Rapportrice

Dr Jean-François ELEOUET, Directeur de recherche, INRAE – Examineur

Dr Grégory CAIGNARD, Ingénieur de recherche, INRAE – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Damien VITOUR

Intitulé de la structure d'accueil : U.M.R.1161 Virologie – Laboratoire de Santé Animale – Agence Nationale de Sécurité Sanitaire – 14 rue Pierre et Marie Curie 94700 Maisons-Alfort

Directeur : **Dr Stéphan ZIENTARA**

et de

Dr Maxime RATINIER

Intitulé de la structure d'accueil EPHE-PSL : U.M.R.754 Infections Virales et Pathologie Comparée – Equipe « Biologie des Bunyvirales » – 50 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon

EPHE-PSL (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE-PSL :

Les cellules et leur environnement : Dynamique des interactions

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury qui me font l'honneur d'évaluer mon travail : Je remercie chaleureusement Madame Sophie Gad-Lapiteau d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de mon mémoire, Madame Sandie Munier d'avoir accepté d'en être la rapportrice, et Monsieur Jean-François Eléouët d'être examinateur.

Je remercie vivement Maxime Ratinier, mon tuteur pédagogique. Merci d'avoir accepté de me suivre durant ces trois années. Ça a été un privilège de t'avoir comme tuteur, je ne pouvais pas rêver mieux pour un projet sur les « NS du BTV ». Un grand merci pour ta bienveillance et ta pédagogie, tes conseils d'ordre scientifique et d'ordre plus humain m'ont été d'une grande aide tout au long de mon parcours.

Je souhaite également remercier l'équipe pédagogique de l'EPHE. Ce fut une formation extrêmement enrichissante et, honnêtement, j'aurais bien voulu continuer pour suivre davantage d'enseignements.

Un immense merci à Damien Vitour, mon tuteur scientifique. Merci de m'avoir cru capable de relever le défi du diplôme EPHE. Je te remercie pour ton écoute et tes encouragements, essentiels dans mes moments de doutes. Le rôle de « tuteur » te sis bien, tes précieux conseils et ton coaching me font grandir chaque jour. Cela fait déjà huit ans qu'avec Greg on a rejoint ta team, mais je sais que j'ai encore beaucoup à apprendre à tes côtés.

Merci à Grégory Caignard alias mon Monsieur Plus. Sache que je te suis très reconnaissante d'être là au quotidien. Merci pour ta disponibilité et ton soutien sans faille, tel un frère de lab'. Merci à tous les deux de m'accorder votre confiance, mais sans vous, il me serait impossible de relever ce défi.

Je tiens à remercier toute l'équipe BIOR, dans laquelle il fait vraiment bon vivre :

Merci à toi Stéphan pour m'avoir, avec Damien, proposé de faire le diplôme EPHE et pour avoir défendu mon dossier pour que cela devienne possible. Un immense merci à Corinne et Manu pour tous vos conseils d'experts, vos encouragements et votre bienveillance. Merci à vous deux d'avoir pris de votre temps pour relire mon mémoire. Merci à Juliette, la reine des boulettes mais aussi de la gentillesse, c'est un réel plaisir de travailler avec toi. Merci également à Mathilde T, Mathilde G et Lydie pour votre dynamisme et votre bonne humeur. Merci aux anciennes thésardes de l'équipe, je ne peux vous oublier : Cindy, sans ton travail, j'aurais dû choisir un autre sujet qui aurait clairement été moins fun. Julie, avec toi j'ai découvert que les révélations de western pouvaient être emplies d'émotions.

Je remercie tous les membres de l'Unité de Virologie : de Bressou ou de Bachelard, qu'on partage un bout de paille, un réactif, un café ou encore un footing, je mesure ma chance de faire partie de ce collectif, riche par la diversité de ses individus.

Parce que la vie est faite d'interactions liées à la probabilité des rencontres, je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ces 15 dernières années. Les interactions que l'on établit avec autrui nous modifient, définissent nos fonctions et déterminent notre devenir. On agit rarement seul. Il y a les interactions qui nous forment, celles qui nous guident, nous transportent, celles qui nous régulent ou qui nous conforment. Que nos interactions soient ou aient été fortes, faibles, stables ou transitoires, elles ont forgé qui je suis aujourd'hui.

Enfin, merci à ma famille et à mes amis d'être présents et de me soutenir. Vous êtes ma ressource et sans vous, mon interactome serait loin d'être complet.

Table des matières

Table des matières	3
Table des abréviations	7
Table des illustrations	9
Introduction	11
1. La fièvre catarrhale ovine : découverte de la maladie	11
2. La fièvre catarrhale ovine : transmission et physiopathologie.....	11
2.1 Modes de transmission	11
2.2 Physiopathologie	13
3. La fièvre catarrhale ovine : épidémiologie	14
3.1 Répartition mondiale de la FCO : avant 1998	14
3.2 Emergence de la FCO dans le sud de l'Europe : de 1998 à 2005.....	15
3.3 Emergence de la FCO dans le nord de l'Europe : de 2006 à 2012.....	16
3.4 Vers un statut enzootique de la FCO en Europe : de 2012 à aujourd'hui	17
3.5 Découverte des sérotypes atypiques	18
4. Contrôle de la maladie	20
5. Description du virus de la fièvre catarrhale ovine	21
5.1 Classification	21
5.2 Structure et génome	21
5.2.1 Le génome	21
5.2.2 La capside externe.....	22
5.2.3 La capside interne.....	23
5.3 Cycle de réplication	23
5.3.1 Entrée du virus par endocytose	23
5.3.2 Réplication cytoplasmique du virus	23
5.3.3 Assemblage dans les corps d'inclusion viraux.....	24
5.3.4 Libération du virus par bourgeonnement ou par lyse cellulaire.....	24
6. Protéines non structurales du virus de la FCO.....	25
6.1 Les protéines NS1 et NS2 : essentielles à la réplication.....	25
6.2 La protéine NS3 : un facteur de virulence important	26
6.2.1 NS3 module la pathogenèse cellulaire et la réplication virale	26
6.2.2 NS3 inhibe la réponse immunitaire innée en amont de la synthèse d'interféron.....	27
6.2.3 NS3 inhibe la réponse immunitaire innée en aval de la synthèse d'interféron	27
6.2.4 NS3 active la voie de signalisation MAPK/ERK.....	29
6.3 La protéine NS4 : un facteur de virulence nucléolaire	29
6.3.1 Séquence codante et conservation dans le génome.....	29
6.3.2 Caractéristiques de la protéine	29
6.3.3 NS4 est capable de se lier à l'ADN double brin	31
6.3.4 NS4 n'est pas essentielle à la réplication virale	31
6.3.5 NS4 donne un avantage de réplication dans les cellules interféron-compétentes.....	31
6.3.6 NS4 antagonise la réponse immunitaire médiée par les interférons	32
6.3.7 NS4 collabore avec NS3 pour bloquer la voie de signalisation JAK/STAT.....	33
6.3.8 NS4 inhibe la transcription cellulaire de manière globale	33
6.4 Les protéines NS5 et NS5a : leur expression est encore putative	34

6.4.1	Séquence codante et conservation dans le génome	34
6.4.2	Caractéristiques de la protéine	35
6.4.3	NS5 inhibe la transcription cellulaire	35
6.4.4	NS5 n'est pas un antagoniste de la voie des interférons	36
6.4.5	NS5 ne module pas la pathogenèse virale	36
Contexte du projet		37
1.	Différences entre sérotypes classiques et atypiques	37
2.	Intérêt d'étudier les interactions protéines virales/protéines cellulaires	37
3.	Interactome comparé des BTV-8 et BTV-27 face à l'hôte bovin et au vecteur culicoïde	38
4.	Objectifs et stratégie employée	39
Matériels et méthodes		41
1.	Cellules	41
2.	Virus	41
3.	Anticorps	41
4.	Amorces et siRNA	42
5.	Vecteurs plasmidiques	43
6.	Constructions plasmidiques	44
6.1	Clonage par système Gateway® (Invitrogen)	44
6.1.1	Principe	44
6.1.2	Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)	45
6.1.3	Réactions BP	45
6.1.4	Transformation bactérienne et extraction d'ADN plasmidique	45
6.1.5	Réaction LR	45
6.2	Mutagenèse dirigée	46
6.3	Vérification par séquençage	46
7.	Test d'interaction des protéines en système de double-hybride en levure	46
7.1	Principe	46
7.2	Test classique	47
7.2.1	Transformation des levures	47
7.2.2	Evaluation des interactions	47
7.2.3	Vérification des partenaires d'interaction par séquençage	48
7.3	Test avec clonage direct en levure par la méthode « <i>gap-repair</i> »	48
7.3.1	Principe	48
7.3.2	Réamplification des produits de PCR issus du crible double-hybride	48
7.3.3	Génération des séquences codant les fragments protéiques	49
7.3.4	Transformation des levures par <i>gap-repair</i>	49
8.	Test d'interaction des protéines par GST <i>pull-down</i>	49
8.1	Principe	49
8.2	Ensemencement et transfection des cellules	49
8.3	Extraction des protéines	50
8.4	Co-purification d'affinité	50
8.5	Analyse de l'expression protéique par <i>western blot</i>	50
9.	Etude du rôle des interacteurs cellulaires sur l'infection par BTV	51
9.1	Stratégie expérimentale	51

9.2	Design des siRNA et des amorces spécifiques à chaque interacteur cellulaire.....	51
9.3	Transfection des cellules par siRNA	52
9.4	Infection des cellules par BTV-8.....	52
9.5	Extraction d'ARN et RTqPCR	52
9.6	Analyse de l'expression protéique par <i>western blot</i>	53
9.7	Titrage viral	53
10.	Détermination de la localisation subcellulaire de l'interaction NS4/WTAP	53
10.1	Principe	53
10.2	Préparation des cellules.....	55
10.3	Réaction de ligature de proximité	55
10.4	Marquage par immunofluorescence classique	55
10.5	Visualisation microscopique	56
11.	Analyses bio-informatiques	56
11.1	Alignement de séquences.....	56
11.2	Analyses statistiques	56
	Résultats.....	57
1.	Constructions plasmidiques	57
2.	Analyse comparative des interactions entre les protéines bovines et la protéine NS4 du BTV-8 et du BTV-27	57
2.1	Par double-hybride en levure.....	58
2.2	Par GST <i>pull-down</i>	59
3.	Etude du rôle des interacteurs cellulaires bovins de NS4 lors de l'infection par le BTV-8	62
3.1	Impact de l'inhibition de WTAP	62
3.2	Impact de l'inhibition de AATF	62
3.3	Impact de l'inhibition de CCHCR1	64
3.4	Impact de l'inhibition de PAWR, BRD2 et LUC7L	64
4.	Caractérisation de l'interaction NS4/WTAP	66
4.1	Etude du degré de conservation de l'interaction	66
4.1.1	Degré de conservation de l'interaction au niveau de l'hôte	66
4.1.2	Degré de conservation de l'interaction au niveau du virus	67
4.2	Identification de domaines protéiques d'interaction pour NS4 et WTAP.....	70
4.2.1	Domaine minimum de NS4.....	70
4.2.2	Domaine minimum de WTAP bovin	72
4.3	Détermination de la localisation cellulaire de l'interaction.....	74
5.	Validation et comparaison des interactions entre les protéines bovines et les protéines NS5, NS5a du BTV-8, NS5 du BTV-27	76
5.1	Par double-hybride en levure.....	76
5.2	Par GST <i>pull-down</i>	77
6.	Etude du rôle des interacteurs cellulaires bovins de NS5 lors de l'infection par le BTV-8	79
	Discussion.....	81
1.	Validation des interactions.....	81
1.1	Clonage des interacteurs	81
1.2	Comparaison des tests d'interaction par Y2H et GST <i>pull-down</i>	81
1.2.1	Tests d'interaction par Y2H	81

1.2.2	Tests d'interaction par GST <i>pull-down</i>	81
2.	Etude fonctionnelle	83
2.1	Inhibition de l'expression des interacteurs cellulaires.....	83
2.2	Impact de leur inhibition sur l'infection par BTV-8.....	83
2.2.1	Effet des interacteurs cellulaires de NS4 : AATF, CCHCR1 et WTAP	84
2.2.2	Effet de l'interacteur cellulaire de NS5 : C1QBP	86
2.2.3	Bilan de l'étude fonctionnelle	87
3.	Caractérisation de l'interaction NS4/WTAP	88
3.1	Caractérisation du côté viral	88
3.2	Caractérisation du côté hôte	89
3.3	Caractérisation de la localisation d'interaction.....	90
4.	Importance de la localisation nucléaire et nucléolaire des protéines NS4 et NS5 du BTV	90
5.	Conclusion générale.....	91
	Bibliographie	93
	Annexes	101
	Annexe 1 : Article publié en janvier 2022 au journal <i>Viruses</i> .	
	Annexe 2 : Comparaison des séquences en acides aminés des formes bovine et culicoïde de WTAP.	

Table des abréviations

Symboles & chiffres

°C : degré Celsius
 µg : microgramme
 µL : microlitre
 µM : micromolaire
 3-AT : 3-amino-1,2,4-triazole

A

aa : acide aminé
 AATF : *apoptosis antagonizing transcription factor*
 AD : *activation domain*
 ADN/ADNc : acide désoxyribonucléique/
 acide désoxyribonucléique complémentaire
 AHSV : *african horse sickness virus*
 ARN/ARNm : acide ribonucléique/acide
 ribonucléique messenger
 ASF/SF2 : *alternative splicing factor/pre-
 mRNA-splicing factor*

B

BD : *DNA binding domain*
 BFAE : *bovine foetal aorta endothelium*
 BHK : *baby hamster kidney*
 BiFC : *bimolecular fluorescence
 complementation*
 BRD : *bromodomain containing*
 BSA : *bovine serum albumin*
 BSR : cellules dérivées des cellules BHK
 BTV : *bluetongue virus*
 BUcEC : *bovine umbilical cord endothelial
 cells*

C

C1QBP : *complement C1q binding protein*
 CCHCR1 : *coiled-coil alpha-helical rod
 protein 1*
 CLIP : *cross linking immunoprecipitation*
 CMV : *cytomegalovirus*
 CPT-Tert : *choroid plexus-SV40 T antigen-
 human telomerase reverse transcriptase*
 CRISPR : *clustered regularly
 interspaced short palindromic repeats*
 Ct : *cycle threshold*
 C-terminale : extrémité carboxy-terminale
 CTR : contrôle

D

DIVA : *differentiation between infected and
 vaccinated animals*
 DMEM : *Dulbecco's modified eagle's medium*

E

EC : extracellulaire
 ECL : électrochimiluminescence
 EDTA : éthylènediaminetétraacétique
 EEV : *equine encephalosis virus*
 EHDV : *epizootic haemorrhagic disease virus*
 Em : émission
 EMCV : virus de l'encéphalomyocardite
 ERK : *extracellular signal regulated kinase*
 Ex : excitation

F/G

FC : forme courte
 FCO : fièvre catarrhale ovine
 FL : forme longue
 GFP : *green fluorescent protein*
 GIV : *great island virus*
 GRN : granuline
 GST : *glutathione S-transferase*

H

HA : hémagglutinine
 HCl : chlorure d'hydrogène
 HCV : *hepatitis C virus*
 HEK293T : *human embryonic kidney 293T*
 His/H : histidine
 HIV : *human immunodeficiency virus*
 hnRNPK : *heterogeneous nuclear
 ribonucleoprotein K*
 HPV : *human papillomavirus*
 HRP : *horseradish peroxidase*

I

IC : intracellulaire
 IF : immunofluorescence
 IFN : interféron
 IFNAR : interféron-α/β récepteur
 IKKe : *inhibitor of nuclear factor kappa-B
 kinase subunit epsilon*
 IRF : *interferon regulatory factor*
 ISG : *interferon stimulated genes*
 ISRE : *interferon-stimulated response element*

J/K/L

JAK : janus kinase
 KANSL2 : *KAT8 regulatory NSL complex subunit 2*
 KCl : chlorure de potassium
 kDa : kilodalton
 KEMV : *Kemerovo virus*
 KIF12 : *kinesin family member 1*
 LB : Luria-Bertani
 LD : *late domain*
 Leu/L : leucine
 LiAc : acétate de lithium
 LUC7L : *LUC7 like*

M

MAPK : *mitogen activated protein kinase*
 MDA5 : *melanoma differentiation associated protein 5*
 MDBK : *Madin Darby bovine kidney*
 MEGF6 : *multiple epidermal growth factor like domains protein 6*
 MEM : *minimal essential medium*
 METTL : méthyltransférase
 mM : millimolaire
 MOI : *multiplicity of infection*

N

NFκB : *nuclear factor-κB*
 ng : nanogramme
 NIH : *National Institutes of Health*
 NLS : *nuclear localization signal*
 nm : nanomètre
 NoLS : *nucleolar localization signal*
 NP40 : nonidet-P40
 NS : non structurale
 NSs : *non structural small*
 N-terminale : extrémité amino-terminale

O

OMSA : organisation mondiale de la santé animale
 OPTN : optineurine
 ORF : *open reading frame*
 ovEC : *ovine aortic endothelial cell*
 ovFib : *ovine primary fibroblast*

P

PALV : *Palyam virus*
 PAMP : *pathogen associated molecular patterns*
 PAWR : *protein kinase C apoptosis wilms*

tumor 1 regulator protein
 pb : paire de bases
 p-bodies : *processing-bodies*
 PBS : *phosphate buffered saline*
 PCV2 : *porcin circovirus type 2*
 PFU : *plaque forming units*
 PHSV : *peruvian horse sickness virus*
 PLA : *proximity ligation assay*
 PML-NB : *promyelocytic leukemia nuclear bodies*
 PRR : *pattern recognition receptors*

R

RIG-I : *retinoic acid-inducible gene I*
 RISC : *RNA induced silencing complex*
 RNA-Seq : *RNA sequencing*
 RPB : *RNA polymerase II subunit*
 RTqPCR : *real time quantitative polymerase chain reaction*

S

SBV : *Schmallenberg virus*
 SCRV : *Saint Croix river virus*
 SDS PAGE : *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
 SFV : *Semliki forest virus*
 SH2 : *Src homology domain 2*
 STAT : *signal transducers and activators of transcription*
 STING : *stimulator of interferon genes*
 SV40 : *simian virus 40*
 SVF : sérum de veau fœtal

T

TBK1 : *tank binding kinase 1-binding protein 1*
 TCID50 : *median tissue culture infectious dose*
 TE : tris EDTA
 TM : transmembranaire
 Trp/W : tryptophane
 Tsg101: *tumor susceptibility gene 101 protein*

V/W/Y

VLP : *virus-like particles*
 VP : *vault protein* - protéine structurale
 WB : *western blot*
 WTAP : *wilms tumor 1 associated protein*
 Y2H : *yeast two-hybrid*
 YPD : *yeast extract peptone dextrose*
 YUOV : *Yunnan orbivirus*

Table des illustrations

Tableau 1 : Nouveaux sérotypes décrits depuis 2008 et leurs caractéristiques.	19
Tableau 2 : Organisation génomique des 10 segments du BTV et caractéristiques des protéines codées.	22
Tableau 3 : Bilan du nombre d'interacteurs cellulaires identifiés à la suite des cribles Y2H des protéines du BTV-8 et du BTV-27.	38
Tableau 4 : Protéines bovines sélectionnées pour l'étude de leur interaction avec NS4 du BTV-8 et BTV-27.	39
Tableau 5 : Protéines bovines sélectionnées pour l'étude de leur interaction avec NS5/NS5a du BTV-8 et BTV-27.	40
Tableau 6 : Anticorps utilisés au cours de ce projet et leurs applications.	41
Tableau 7 : Amorces utilisées pour les clonages et les RTqPCR.	42
Tableau 8 : siRNA utilisés pour inhiber l'expression des protéines cellulaires bovines.	43
Tableau 9 : Vecteurs plasmidiques utilisés pour le clonage et l'expression des protéines d'intérêt.	43
Tableau 10 : Bilan comparatif des tests d'interaction réalisés par Y2H et par GST <i>pull-down</i>	82
<hr/>	
Figure 1 : Moucheron hémaphages du genre <i>Culicoides</i>	11
Figure 2 : Modes de transmission du virus de la FCO.	12
Figure 3 : Exemples de signes cliniques évocateurs de la FCO.	14
Figure 4 : Estimation de l'aire de répartition mondiale du virus de la FCO avant 1998.	15
Figure 5 : Incursions de multiples souches de BTV dans le sud de l'Europe entre 1998 et 2005.	16
Figure 6 : Zones réglementées de fièvre catarrhale ovine en Europe au 28 juillet 2022.	18
Figure 7 : Schéma représentant la particule virale du BTV.	21
Figure 8 : Schéma du cycle de réplication du virus de la fièvre catarrhale ovine.	25
Figure 9 : Représentation schématique de la protéine NS3 du BTV.	26
Figure 10 : Schéma simplifié de l'activation de la voie des interférons suite à l'infection par BTV.	28
Figure 11 : Représentation schématique de la protéine NS4 du BTV.	31
Figure 12 : Comparaison des séquences en acides aminés des NS5 et NS5a du BTV-8 avec quelques NS5 de BTV atypiques.	35
Figure 13 : Représentation schématique de la protéine NS5 du BTV.	35
Figure 14 : Stratégie employée pour l'étude des interactions protéines virales/protéines cellulaires.	40
Figure 15 : Stratégie de clonage Gateway®.	44
Figure 16 : Principe du double-hybride en levure.	47
Figure 17 : Principe du clonage direct en levure par <i>gap-repair</i>	48
Figure 18 : Stratégie expérimentale pour étudier l'impact de l'inhibition des partenaires cellulaires de NS4 et NS5 sur l'infection par le BTV-8.	51
Figure 19 : Essai de la ligature de proximité (PLA).	54

Figure 20 : Validation et comparaison des interactions entre les protéines cellulaires bovines et les NS4 du BTV-8 et du BTV-27 par le système de double-hybride en levure.	59
Figure 21 : Test et comparaison des interactions entre les protéines cellulaires bovines et les NS4 du BTV-8 et du BTV-27 par la méthode de GST <i>pull-down</i>	61
Figure 22 : Impact de l'inhibition d'expression des interacteurs bovins WTAP et AATF sur l'infection par BTV-8.	63
Figure 23 : Impact de l'inhibition d'expression des interacteurs bovins CCHCR1, PAWR, BRD2 et LUC7L sur l'infection BTV-8.	65
Figure 24 : Etude du degré de conservation de l'interaction entre les NS4 du BTV-8 et -27 et WTAP caprin.....	67
Figure 25 : Etude du degré de conservation de l'interaction entre WTAP bovin et les NS4 de sérotypes classiques et atypiques du BTV.	69
Figure 26 : Cartographie de la région d'interaction de NS4 du BTV-8 avec WTAP bovin par système Y2H.....	71
Figure 27 : Détermination de l'importance du domaine 22-55 de BTV8-NS4 dans l'interaction avec WTAP bovin.	72
Figure 28 : Détermination du domaine de WTAP minimum à l'interaction avec NS4 du BTV8.....	73
Figure 29 : Etude de co-localisation de WTAP et NS4 par la méthode de <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA).	76
Figure 30 : Validation et comparaison des interactions entre les protéines cellulaires bovines et NS5/NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27 par le système de double-hybride en levure.	77
Figure 31 : Test et comparaison des interactions entre les protéines cellulaires bovines et NS5/NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27 par la méthode de GST <i>pull-down</i>	78
Figure 32 : Impact de l'inhibition d'expression des interacteurs bovins hnRNPK et C1QBP sur l'infection BTV-8.....	80
Figure 33 : Bilan de l'impact de l'inhibition d'expression des interacteurs cellulaires sur l'infection BTV.....	88
Figure 34 : Schéma représentant le bilan de l'étude des interactions de NS4 et NS5 du BTV.	92

Introduction

1. La fièvre catarrhale ovine : découverte de la maladie

La première description d'une fièvre catarrhale observée chez des moutons mérinos a été faite par Hutcheon et Spreull en 1902 en Afrique du Sud. Quatre ans plus tard, l'agent pathogène responsable de la maladie a été découvert par Theiler et caractérisé comme un agent ultra-filtrable suggérant une étiologie virale. L'agent causal fut dénommé virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) ou *Bluetongue virus* en anglais (BTV). Dès 1940, le BTV a pu être cultivé sur œufs embryonnés et sa transmission vectorielle a été caractérisée avec l'identification du vecteur *Culicoides imicola*, un moucheron hématophage capable de transmettre la maladie. A cette période, il a également été démontré que le BTV comprenait différents sérotypes et que la maladie était enzootique au continent Africain. L'introduction de races ovines sensibles a permis la mise en évidence de la maladie alors que les espèces de ruminants autochtones, quand bien même infectées, y résistaient [1].

2. La fièvre catarrhale ovine : transmission et physiopathologie

2.1 Modes de transmission

L'infection par le virus de la fièvre catarrhale ovine est considérée non contagieuse car est liée à une transmission essentiellement vectorielle, par morsure d'un moucheron hématophage du genre *Culicoides* (Figure 1).



Figure 1 : Mouchérons hématophages du genre *Culicoides*.

Source : Wilson *et al.* [2].

Après un repas sanguin sur un animal infecté, le virus passe la paroi intestinale du vecteur et se dissémine dans le corps de l'insecte jusqu'à atteindre les glandes salivaires où il se multiplie. Le virus est alors excrété dans la salive et peut être transmis à un autre animal lors d'un nouveau repas sanguin (Figure 2) [3].

Les culicoïdes sont des petits diptères faisant 1 à 4 mm de long et appartenant à la famille des *Cératopogonidés* [1]. Il existe plus de 1250 espèces de culicoïdes dans le monde. L'espèce *Culicoides imicola* a été la première identifiée comme impliquée dans la transmission du BTV. D'autres espèces ont depuis été décrites comme compétentes pour la transmission du virus et varient selon la région du monde. Ainsi, *C. imicola* est retrouvé en Afrique et dans le bassin méditerranéen. Les vecteurs majoritaires sont *C. sonorensis* en Amérique du Nord, *C. insignis* et *pusillus* en Amérique du Sud et

C. brevitarsis en Australie. En ce qui concerne l'Europe, les vecteurs identifiés sont *C. pulicaris* en Sicile, *C. obsoletus et scoticus* dans le centre de l'Italie et enfin, *C. dewulfi* dans le nord de l'Europe [3]. L'efficacité de transmission par le vecteur est également liée à la capacité vectorielle du BTV qui peut être très différente d'une souche virale à une autre. Il a récemment été montré que le segment 2 du virus jouait un rôle essentiel pour la répllication virale chez le vecteur culicoïde [4,5].

La FCO s'avère être une maladie saisonnière liée à l'activité vectorielle qui est accrue en été et à l'automne dans les régions tempérées et dès le printemps pour les régions subtropicales. Durant l'hiver, d'autres modes de transmission sont à prendre en compte pour expliquer la résurgence du virus (**Figure 2**) [2]. Tout d'abord, la survie du virus chez le vecteur culicoïde pendant cette période est possible. Les culicoïdes adultes peuvent survivre à la température hivernale en se mettant par exemple à l'abri dans les bâtiments agricoles [6]. Il est également suspecté que le virus puisse persister chez son hôte. L'espèce bovine est celle chez qui la virémie est la plus longue. Même si ordinairement elle dure moins de 60 jours, elle peut parfois être allongée et ainsi permettre au virus de persister pendant 3 à 4 mois sans nouveau cycle d'infection [2]. D'autre part, l'infection du fœtus par quelques souches du virus de la FCO a été observée chez les bovins, démontrant une transmission transplacentaire. Rarement décrite avant l'apparition du sérotype BTV-8 dans le nord de l'Europe, ce mode d'infection a pu toucher 10% des cas de gestation lors de l'épizootie de cette souche de 2006/2008 [1]. Une transmission vénérienne est également possible, même si elle reste rare. Les mâles en infection aigüe peuvent excréter le virus dans le sperme. L'infection à BTV peut alors se faire par la saillie ou via insémination avec la semence contaminée [1]. Enfin, la transmission horizontale entre hôtes mammifères est une autre possibilité de survie du virus durant l'hiver [2]. La transmission par contact direct a notamment été démontrée pour trois sérotypes atypiques (BTV-26 à 28) dont les caractéristiques seront détaillées en [section 3.5](#) [7–9].

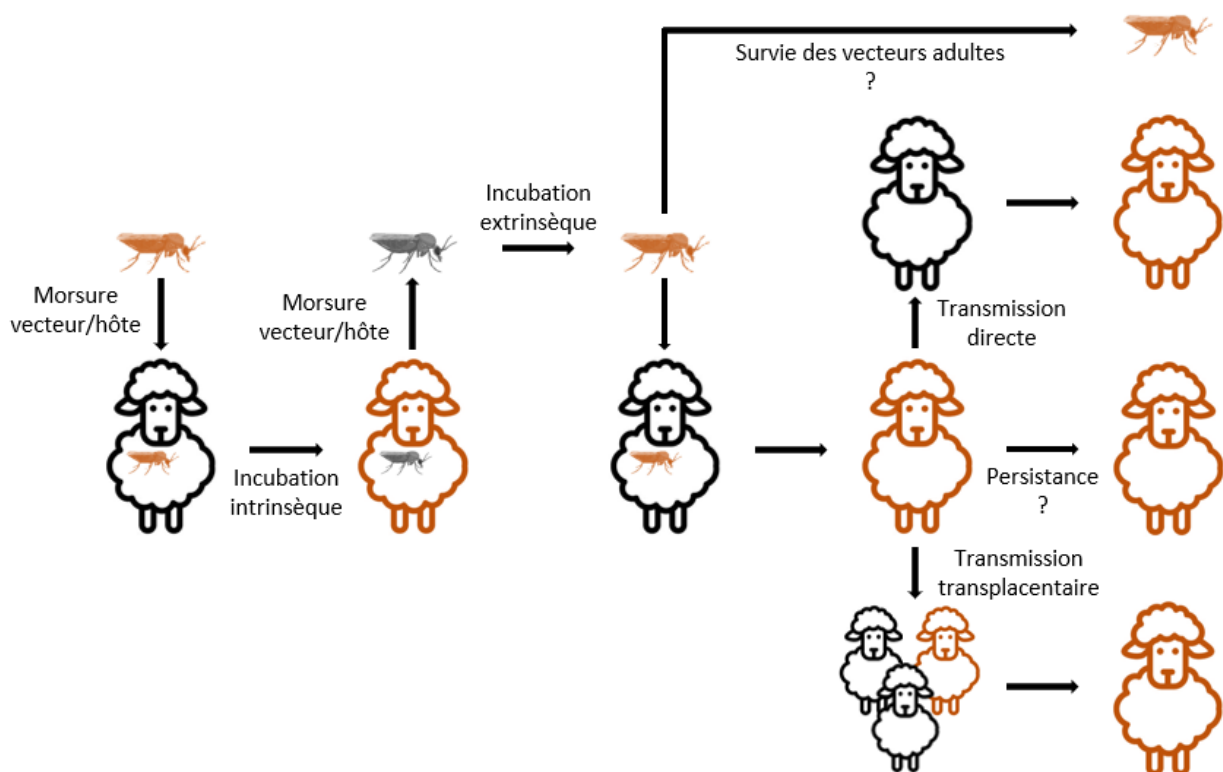


Figure 2 : Modes de transmission du virus de la FCO.

Réalisé d'après Wilson *et al.*[10]. Les animaux/insectes infectés figurent en orange.

2.2 Physiopathologie

Chez l'animal, après l'infection par une morsure de culicoïde, le virus de la FCO atteint les nœuds lymphatiques où il se multiplie, puis se dissémine vers d'autres organes et se réplique dans les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules dendritiques. Le BTV est adsorbé à la surface des érythrocytes et des plaquettes pendant la virémie et se multiplie dans les monocytes et les lymphoblastes. La période de virémie dépend de la durée de vie des érythrocytes et est plus longue dans l'espèce bovine (jusqu'à 60 jours) que dans les espèces ovine (entre 14 et 35 jours) et caprine (jusqu'à 31 jours) [3].

Le virus de la FCO est capable d'infecter les ruminants domestiques et sauvages avec une période d'incubation, en moyenne de 6 à 8 jours. La pathogénie de la FCO dépend de la souche du virus, du vecteur et de l'espèce infectée. Ainsi, l'espèce ovine est la plus sensible à la maladie alors que les espèces bovine et caprine développent davantage des formes inapparentes ou subcliniques et sont suspectées d'être un réservoir du virus. Cependant, l'épizootie de BTV-8 survenue en Europe en 2006 a montré que ces espèces pouvaient également développer de forts signes cliniques [1,11].

Sous sa forme aigüe, la FCO se traduit tout d'abord par une forte fièvre accompagnée d'un abattement. Un œdème de la face, la congestion des muqueuses (nasale, buccale, gingivale) et une conjonctivite représentent les signes cliniques classiques (**Figure 3**). La maladie peut évoluer avec l'apparition d'œdème pulmonaire, d'ulcérations et d'hémorragies sur le museau et les muqueuses orales. Une inflammation du bourrelet coronaire peut également se développer et engendrer de la boiterie et une raideur des membres. Dans de rares cas, une cyanose de la langue peut apparaître, ce symptôme ayant donné le nom de « *bluetongue* » au virus. Dans les formes les plus sévères, des lésions hémorragiques sont observées au niveau des muqueuses digestives, génito-urinaires et respiratoires ainsi qu'au niveau du tissu conjonctif [1,3,12]. Lors d'infection par le BTV-8, des troubles de la reproduction sont aussi rapportés chez les bovins. Les mâles peuvent présenter une infertilité. Chez la femelle gestante, le passage transplacentaire du virus provoque différents signes cliniques chez le fœtus selon la période de gestation. Au début de celle-ci, l'infection provoque une mortalité embryonnaire et fœtale. Des anomalies congénitales et principalement des malformations cérébrales (cécité, hydranencéphalie) surviennent si l'infection a lieu au deuxième tiers de la gestation (**Figure 3**) [13].

La morbidité (nombre d'animaux malades sur nombre d'animaux total d'un cheptel) et la mortalité (nombre d'animaux morts sur nombre d'animaux total du cheptel) dues à la FCO varient beaucoup en fonction de l'espèce touchée, de la souche virale, ainsi que de l'état de l'individu atteint (âge, état de santé, statut immunitaire de l'hôte). Par exemple, en 2006, l'épizootie de BTV-8 a engendré en moyenne une morbidité et une mortalité dans l'espèce ovine, respectivement de 20% et 5% et dans l'espèce bovine, de 6,8% et 0,3% [1].



Figure 3 : Exemples de signes cliniques évocateurs de la FCO.

a : œdème de la face, b : inflammation du bourrelet coronaire, c : ulcère et signes hémorragiques, d : hydranencéphalie
Sources : (a, b) Plateforme ESA, (c) Guy Czaplicki, ARSIA, (d) Guillaume Belbis, ENVA.

3. La fièvre catarrhale ovine : épidémiologie

3.1 Répartition mondiale de la FCO : avant 1998

Considérée comme exclusivement liée au continent africain au début du XX^{ème} siècle, des premiers cas de fièvre catarrhale ovine ont été rapportés hors du continent comme aux Etats-Unis (1952), en Inde (1954) ou encore en Australie (1975). A partir de cette époque et jusqu'au début des années 2000, la répartition géographique de la FCO s'est ainsi étendue en Amérique, en Asie et en Australie. L'impact de la FCO sur l'espèce ovine entrainera des pertes économiques mondiales évaluées en 1996 à 3 milliards de dollars par an [12]. A la fin des années 1990, la FCO était cependant encore limitée aux régions subtropicale et tropicale, entre 40 et 50° de latitude nord et 20-30° de latitude sud correspondant à la répartition des espèces de culicoïdes reconnues comme vectrices du virus de la FCO (**Figure 4**) [10].

Avant les années 2000, les incursions sur le continent européen étaient de courte durée et cantonnées au sud de l'Europe, dans le pourtour méditerranéen. Des foyers de FCO ont ainsi été décrits à Chypre (1943), en Espagne et au Portugal (entre 1956 et 1960), ainsi qu'en Grèce (1979) [14].

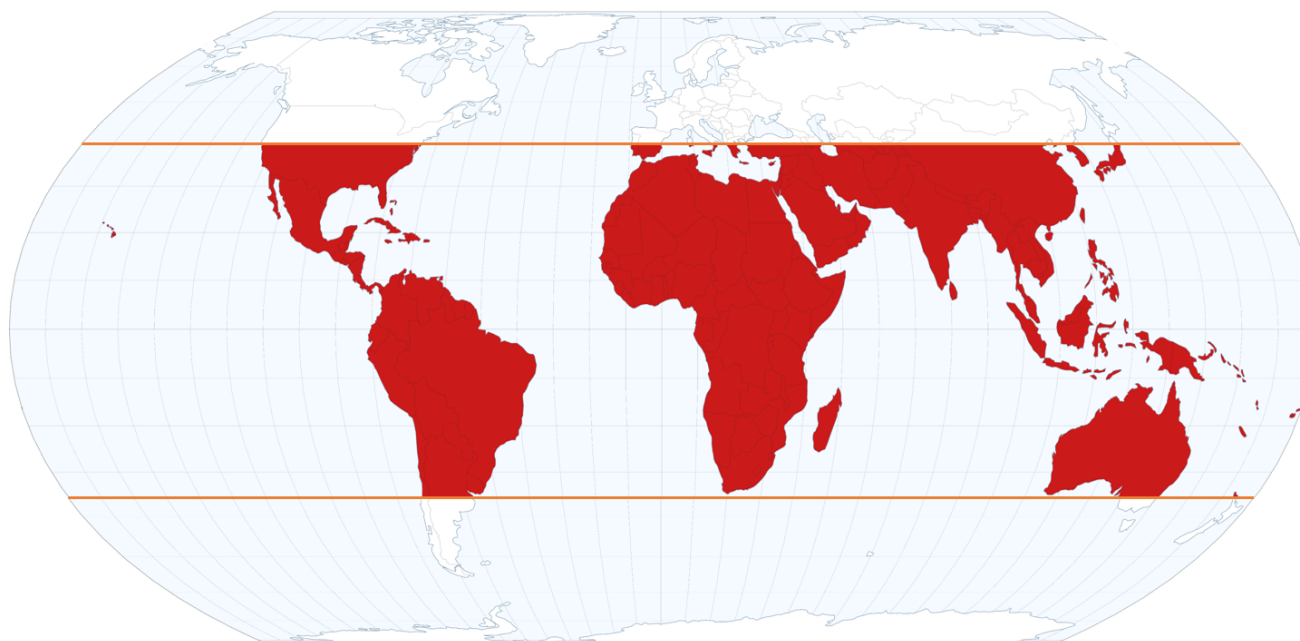


Figure 4 : Estimation de l'aire de répartition mondiale du virus de la FCO avant 1998.

Source : Natural Earth, réalisé avec Graticule. D'après Wilson *et al.* [10].

3.2 Emergence de la FCO dans le sud de l'Europe : de 1998 à 2005

La fin des années 1990 et le début des années 2000 a vu progressivement s'étendre l'aire de répartition géographique de la FCO. Ceci s'expliquerait d'une part par le réchauffement climatique induisant le changement des écosystèmes. Le vecteur *Culicoides imicola* originellement présent en Afrique et en Asie a pu ainsi s'étendre dans de nouvelles régions devenues aptes à l'héberger. D'autre part, le virus s'est adapté à de nouvelles espèces du vecteur culicoïde présentes au-delà des régions jusqu'alors infectées. Le commerce mondial impliquant des mouvements d'animaux est, certainement, également une des causes de l'expansion de la maladie en Europe et dans le monde.

Entre 1998 et 2005, 7 souches distinctes du virus de la FCO issues de 5 sérotypes différents se sont introduites dans le sud de l'Europe [15]. Deux voies d'incursions se distinguent et sont à l'origine de ces nouveaux foyers d'infection dans le bassin méditerranéen (**Figure 5**).

Par la voie dite « orientale », plusieurs souches de BTV sont arrivées par la Turquie et la Grèce ; une souche de BTV-4 en 1999 et une de BTV-16 en 2000 ont fait leur apparition en Grèce, ainsi qu'une souche de BTV-1 sur l'île Grecque de Lesbos en 2001. Contrairement à ces souches qui n'ont pas été capables de réémerger après l'hiver, la souche orientale de BTV-9 détectée dès la fin des années 1990 dans les îles grecques s'est propagée en Turquie, dans les pays Balkans et en Italie entre 2000 et 2002 [16]. Sa persistance durant plusieurs années montre la capacité du virus à se maintenir sur le continent Européen pendant les périodes hivernales.

Par la voie dite « occidentale », des souches de BTV en provenance d'Afrique du Nord ont tout d'abord infecté les îles méditerranéennes puis, pour certaines, ont atteint les pays du sud de l'Europe. C'est ainsi qu'une souche de BTV-2 circulant en Tunisie dès 1999 atteindra les îles Baléares, la Sicile, la Sardaigne et la Corse en 2000. Cette souche réémergera en 2001 en Corse après la période hivernale. Par ailleurs, une souche de BTV-4 a été détectée en 2003 en Sardaigne, en Corse et à Minorque avant de se répandre en Espagne et au Portugal en 2004.

En Corse, la mise en œuvre de deux campagnes de vaccination successives employant des vaccins vivants atténués contre le BTV-2 et le BTV-4 aura permis l'éradication de ces deux souches, qui depuis, n'ont plus été détectées en Corse. Cependant, l'utilisation de vaccins atténués pour lutter contre la FCO sera rapidement arrêtée en Europe. En effet, une souche de BTV-16 correspondante à une souche vaccinale atténuée produite en Afrique du sud et utilisée en Italie a été isolée en Corse en 2004. Il s'est avéré que le virus atténué était capable d'engendrer une virémie chez les animaux vaccinés voir des signes cliniques et être transmis à des animaux sains par le vecteur culicoïde [15]. Dès lors en Europe, seuls les vaccins inactivés seront utilisés dans la stratégie prophylactique anti-FCO.

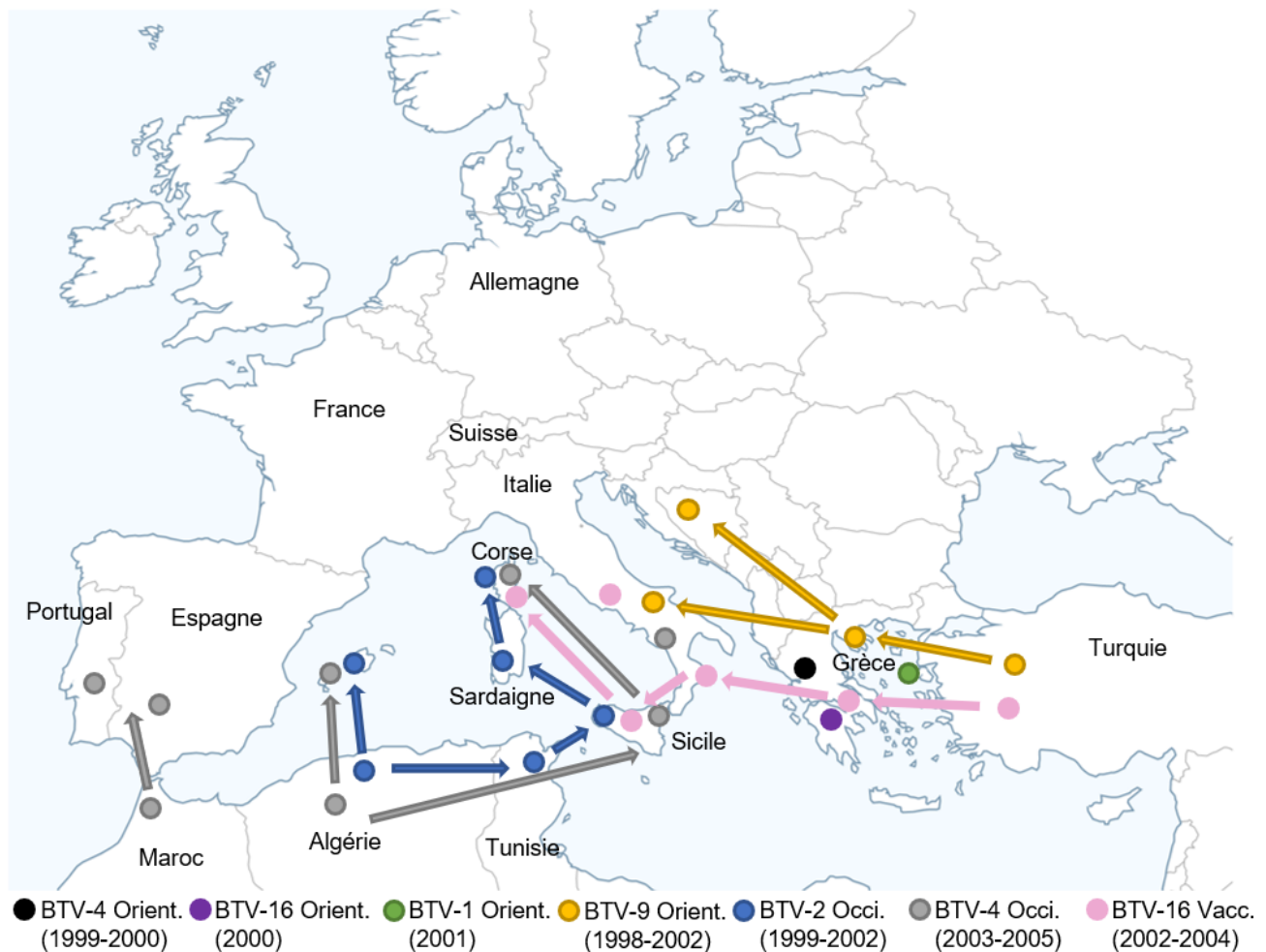


Figure 5 : Incursions de multiples souches de BTV dans le sud de l'Europe entre 1998 et 2005.

Source : Natural Earth, réalisé avec Graticule. D'après : Kundlacz *et al.* [15].

3.3 Emergence de la FCO dans le nord de l'Europe : de 2006 à 2012

En 2006, c'est à une latitude encore jamais atteinte par le virus de la FCO qu'a émergé le BTV-8 dans le nord de l'Europe. Des premiers foyers de FCO ont été observés au mois d'août aux Pays-Bas avant une propagation rapide du virus en Belgique, en Allemagne et en France. Le vecteur *C. imicola* n'étant pas présent dans cette région du globe, c'est l'adaptation du BTV-8 aux espèces autochtones de culicoïdes (*C. obsoletus*, *dewulfi*, *scoticus*, *chiopterus*) qui lui a permis de se maintenir et de réapparaître l'année suivante dès la reprise de l'activité vectorielle [17]. En plus des pays déjà touchés en 2006, le BTV-8 a atteint le Luxembourg, le Danemark, le Royaume-Uni, la Suisse, la République

Tchèque et la Suède causant ainsi une épizootie sans précédent. L'origine et le mode d'introduction du BTV-8 dans le nord de l'Europe sont toujours indéterminés [18]. Cependant, le séquençage de la souche suggère qu'elle aurait une origine africaine [19]. Cette souche s'est montrée particulière à bien des égards et principalement par sa pathogénicité. En effet, en plus de la virulence habituellement observée chez l'espèce ovine, le BTV-8 a provoqué des signes cliniques dans l'espèce bovine, ordinairement non sensible à la FCO [20]. En outre, ce sérotype possède la capacité à passer la barrière transplacentaire et ainsi infecter le fœtus de femelles gestantes [13]. Des mesures de restriction des mouvements d'animaux ainsi que des campagnes de vaccination avec l'utilisation de vaccins inactivés ont été appliquées en Europe afin de contenir la propagation du virus. C'est ainsi que les pays Européens ont retrouvé un statut indemne de BTV-8 entre 2010 et 2012. Néanmoins, cette épizootie aurait occasionné des pertes économiques supérieures à toutes les précédentes épizooties cumulées [1].

En parallèle de cette émergence, à l'été 2007, une souche de BTV-1 provenant du nord de l'Afrique atteindra la Sardaigne et la péninsule Ibérique puis les régions de l'ouest de la France. En France, cette période est ainsi marquée par la double circulation du BTV-1 et du BTV-8 avec des cas de co-infections et la genèse de virus réassortants [21]. Il est à noter qu'en 2008, d'autres sérotypes ont également émergé et circulé à bas bruit dans le nord de l'Europe avant de disparaître naturellement (BTV-6 en Allemagne et aux Pays-Bas et BTV-11 en Belgique) [14].

3.4 Vers un statut enzootique de la FCO en Europe : de 2012 à aujourd'hui

De 2012 à 2015, des souches des sérotypes BTV-1 et BTV-4 ont circulé dans le sud de l'Europe. En 2012, une nouvelle incursion de BTV-1 venant de Tunisie a atteint la Sicile, la Sardaigne, l'Italie et la Corse avant de provoquer en 2013 une épidémie massive en Italie. La vaccination des cheptels en Corse a permis d'éradiquer ce sérotype après 2014. L'année 2012 a également été marquée par la détection d'une souche de BTV-4 en Sardaigne sans se propager au-delà. Cette souche s'est avérée génétiquement proche des souches occidentales tout en possédant le segment 5 d'un BTV-1. Elle est issue d'un réassortiment entre deux souches co-circulantes dans le bassin méditerranéen entre 1999 et 2005 [22]. Enfin, en 2014, une souche de BTV-4 d'origine orientale a été détectée en Grèce puis en Hongrie et dans les Balkans [14].

En septembre 2015, le BTV-8 a réémergé en France où il a été détecté chez un bélier du département de l'Allier présentant des signes cliniques évocateurs de la FCO. En l'absence de campagne de vaccination obligatoire, le virus s'est propagé dans toute la France, puis a atteint l'Allemagne, la Suisse et la Belgique en 2019. Bien que la souche soit identique à celle responsable de l'épizootie de 2006-2008, le BTV-8 a provoqué peu de signes cliniques en comparaison à la précédente épizootie [23]. Une immunité partielle des animaux due à une ancienne infection ou à une vaccination pourrait expliquer cette différence dans la physiopathologie. Il n'est cependant pas à exclure une possible modification de la virulence du virus [24]. L'origine de la réémergence de BTV-8 n'est pas clairement élucidée. Cependant, en tenant compte de la très faible variabilité génétique observée entre la souche de 2006 et celle de 2015, l'hypothèse d'une réémergence via une intervention humaine est privilégiée. Le BTV-8 étant capable de se transmettre par voie vénérienne, il est possible que l'utilisation de semence contaminée par le virus soit à l'origine de cette réémergence. La conservation de semences de taureaux puis l'insémination les saisons suivantes dans les troupeaux d'origines est autorisée sans que ces semences soient soumises à contrôle sanitaire [25].

En fin d'année 2016, une souche de BTV-4 provenant de Hongrie a été identifiée en Corse puis a atteint la France continentale dans le département de la Haute-Savoie en 2017 [26]. Malgré la mise en place d'une campagne de vaccination dans cette région, des cas de BTV-4 ont été rapportés dans d'autres départements du pays.

C'est ainsi que la circulation des souches de BTV-4 et de BTV-8 est aujourd'hui enzootique en France. Actuellement, une souche de BTV-1 circule également sur le continent Européen (**Figure 6**).

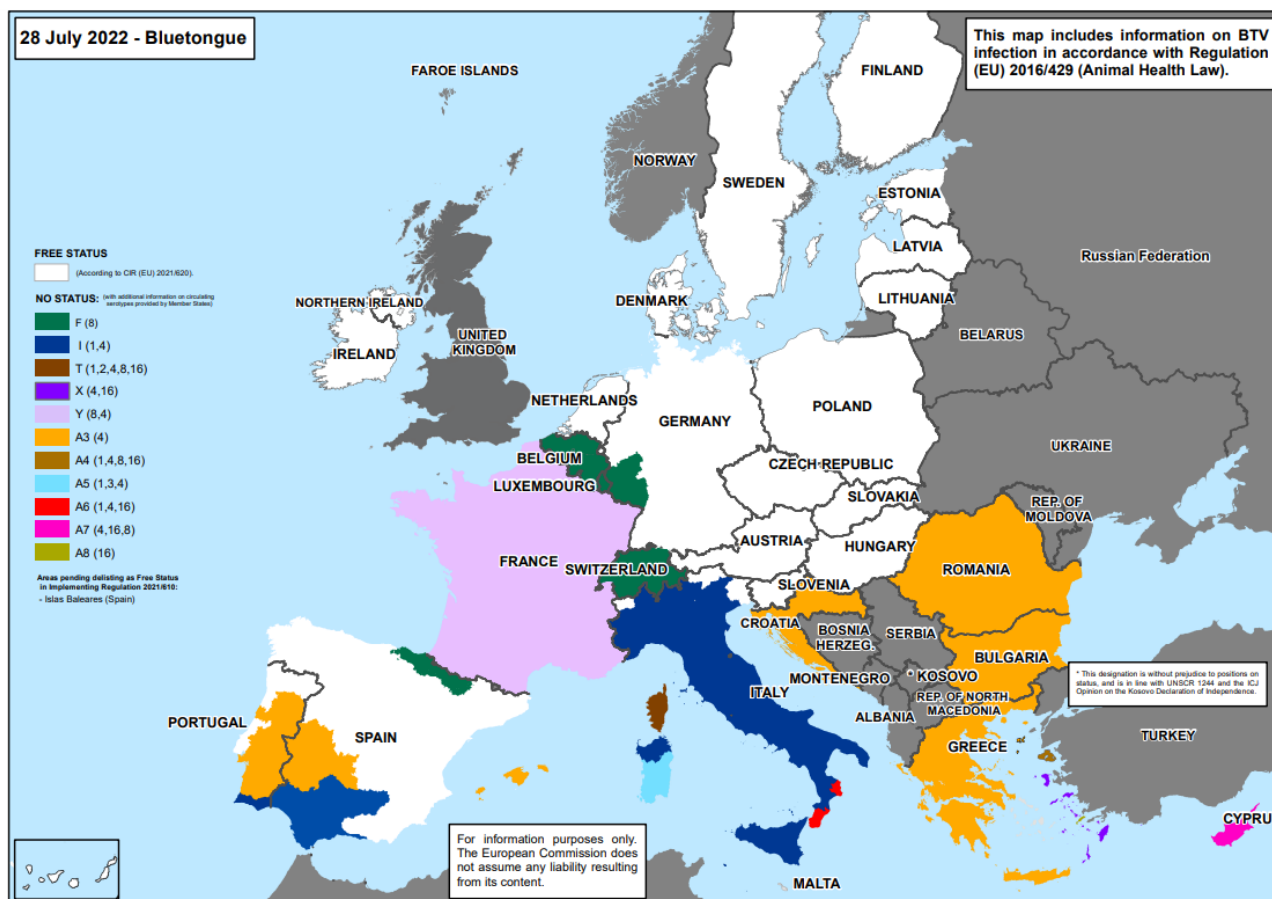


Figure 6 : Zones réglementées de fièvre catarrhale ovine en Europe au 28 juillet 2022.

Source : https://food.ec.europa.eu/system/files/2022-07/ad_control-measures_bt_restrictedzones-map_0.pdf

3.5 Découverte des sérotypes atypiques

Afin de suivre la circulation des souches et d'anticiper l'émergence d'épizootie en Europe, des programmes de surveillance ont régulièrement été mis en place durant les 20 dernières années. Au-delà de ces objectifs, la surveillance de la circulation de FCO par détection du génome viral alliée au séquençage des souches par des méthodes de nouvelle génération a permis d'identifier de nouveaux sérotypes de BTV [14].

La détermination du sérotype est basée sur le segment 2 du virus qui code pour l'antigène viral VP2. Ces souches nouvellement découvertes n'ont pas pu être typées par la méthode de séroneutralisation classique car celle-ci nécessite d'avoir un sérum de référence contre ces souches. Cependant, il a été démontré qu'il existait une grande corrélation entre la séquence complète du segment 2 et l'appartenance à un sérotype [27]. Aussi, des seuils d'identités des nucléotides et des acides aminés ont été proposés pour déterminer l'appartenance de souches à un même sérotype ou à

un sérotype différent : deux souches de même sérotype doivent avoir au minimum une homologie de séquence nucléotidique de 68,4% et protéique de 72,6%, deux souches de sérotypes différents peuvent avoir une homologie de séquence nucléotidique allant jusqu'à 71,5% et protéique jusqu'à 77,8% [28]. L'analyse phylogénétique du segment 2 des souches nouvellement identifiées a montré des séquences virales suffisamment distinctes des 24 sérotypes précédemment déterminés [28,29]. C'est ainsi que 12 nouveaux sérotypes nommés de BTV-25 à BTV-36 ont été décrits entre 2008 et 2019 (**Tableau 1**) [7–9,28–41].

Ils sont dits « atypiques » car ils divergent des souches classiques (BTV-1 à -24) par plusieurs caractéristiques. Tout d'abord, ils ont été retrouvés exclusivement chez des petits ruminants et, plus particulièrement, dans l'espèce caprine. De plus, ces animaux infectés étaient asymptomatiques ou présentaient très peu de signes cliniques [7,41]. Par ailleurs, des infections expérimentales ont montré la capacité pour les sérotypes 26 et 27 à pouvoir se transmettre directement d'une chèvre à une autre, indépendamment de la présence de culicoïdes. Le BTV-28 a également été montré comme pouvant se transmettre par contact direct chez le mouton [9]. Cette dernière particularité pourrait corrélérer avec une capacité à se répliquer dans des cellules de mammifères mais pas dans des cellules du vecteur culicoïde (cellules KC) [7,8]. Par ces caractéristiques biologiques, les sérotypes atypiques se classent vraiment à part des 24 sérotypes classiques qui eux, possèdent une transmission vectorisée et une virulence certaine [28].

Tableau 1 : Nouveaux sérotypes décrits depuis 2008 et leurs caractéristiques.

ni=non indiqué

Sérotype	Pays d'origine	Année de collection	Hôte	Réplication en cellule mammifère/vecteur	Transmission horizontale
BTV-25	Suisse	2008	Chèvre	non/oui	non
BTV-25	Italie	2017	Chèvre	ni	ni
BTV-25	Allemagne	2020	Chèvre	oui/ni	non
BTV-26	Koweït	2010	Mouton	oui/non	oui
BTV-27	France (Corse)	2014	Chèvre	oui/non	oui
BTV-28 (vaccin)	Israël	2014	Mouton	oui/ni	oui
BTV-29 (vaccin)	Israël	2014	Mouton	ni	ni
BTV-30	Chine	2014	Chèvre/mouton	oui/ni	non
BTV-30	Mongolie	2016	Chèvre/mouton	oui/ni	ni
BTV-31	Chine	2014	Chèvre/mouton	oui/oui	ni
BTV-32	Italie	2015	Chèvre	non/non	ni
BTV-33	Mongolie	2016	Chèvre/mouton	oui/ni	non
BTV-34 (vaccin)	Tunisie	2017	Mouton	non/ni	ni
BTV-35	Mongolie	2018	Chèvre/mouton	oui/non	ni
BTV-36	Suisse	2019	Chèvre	oui/ni	non

4. Contrôle de la maladie

La détection de l'infection du bétail par une souche de BTV de sérotype classique (1 à 24) est soumise à déclaration obligatoire auprès de l'organisation mondiale de la santé animale (OMSA). Selon la situation épidémique du moment, une restriction des mouvements d'animaux peut être mise en place afin de limiter la propagation de la maladie [42]. Cependant, la fièvre catarrhale ovine se transmettant principalement par le biais du vecteur culicoïde, la dissémination de la maladie est difficile à contrôler.

La vaccination des animaux représente à ce jour le moyen de lutte le plus efficace [43]. Du fait du rôle clé de la protéine virale VP2 dans l'immunogénicité, l'activité protectrice des vaccins anti-BTV est spécifique au sérotype. Actuellement, deux types de vaccins sont commercialisés dans le monde et présentent chacun des avantages et des inconvénients [12]. Les vaccins à virus vivant atténué produits par Onderstepoort Biological Products (Afrique du Sud) sont utilisés depuis longtemps chez les ovins en Afrique australe, et ont été utilisés au début des années 2000 dans le sud de l'Europe. Ce type de vaccin permet d'obtenir une forte réponse immunitaire et une protection relativement longue après une seule injection. De plus, leur coût de production est modéré. Cependant, ces vaccins, en raison d'une sous-atténuation, peuvent entraîner des signes cliniques légers et provoquer une longue virémie chez l'animal vacciné. Il engendre alors un risque de propagation via le vecteur ainsi qu'un retour à la virulence et à des événements de réassortiment avec le virus sauvage circulant [12]. En raison de ces risques, ce type de vaccin est interdit d'utilisation en Europe depuis 2006 [15]. Les vaccins à virus inactivé ne peuvent être transmis d'un animal à un autre mais coûtent relativement cher et nécessitent souvent deux injections pour obtenir une réponse immunitaire protectrice. Ils constituent actuellement le meilleur compromis entre sécurité et efficacité. Le désavantage de ces deux types de vaccins est qu'ils ne permettent pas de distinguer sérologiquement les animaux malades des animaux vaccinés (*Differentiation between Infected and Vaccinated Animals*, DIVA) afin de faciliter les échanges d'animaux. Aussi, le vaccin anti-BTV idéal n'a, à ce jour, pas encore été développé et devrait posséder les caractéristiques suivantes : être efficace et ne pas constituer un danger sanitaire, être à prix abordable, induire rapidement une protection multi-sérotypes à vie chez toutes les espèces de ruminants sensibles à la FCO et permettre la distinction entre animaux infectés et vaccinés [12].

Aussi, le développement de nouveaux types de vaccins est toujours à l'étude. Des vaccins protéiques mimant la particule virale (type *Virus-Like Particles*, VLP) ou encore des vaccins à vecteurs viraux ont un potentiel DIVA selon les antigènes viraux sélectionnés mais sont plus coûteux et pour certains moins efficaces que les vaccins utilisés actuellement [44]. Plus récemment, d'autres candidats vaccins DIVA ont été développés par génétique inverse. Par exemple, un de ces vaccins est basé sur un virus atténué de la FCO par blocage de l'expression des protéines virales NS3/NS3a et possédant un segment 2 (codant pour VP2) du sérotype ciblé. Ce prototype de vaccin a montré son innocuité et son efficacité chez l'espèce ovine et bovine, il peut également présenter l'avantage d'être multivalent. Bien qu'il ne soit pas encore autorisé sur le marché, la souplesse de production de ce type de vaccin le rend prometteur pour la lutte anti-BTV [45].

5. Description du virus de la fièvre catarrhale ovine

5.1 Classification

Le virus de la fièvre catarrhale ovine appartient à l'ordre des *Reovirales*, à la famille des *Sedoreoviridae* et au genre *Orbivirus* [46]. Le genre *Orbivirus* comporte 22 espèces virales qui provoquent principalement des maladies chez l'animal. Il s'agit d'arbovirus transmissibles à l'hôte par des vecteurs arthropodes comme les tiques, phlébotomes, moustiques et moucheron hémato-phages. Le panel d'espèces de vertébrés infectés est large et comprend notamment les bovins, caprins, ovins, ruminants sauvages, équidés et camélidés. Trois orbivirus ont un impact important sur l'économie des filières animales. Il s'agit du virus de la maladie hémorragique épizootique (*Epizootic haemorrhagic disease virus*, EHDV), du virus de la peste équine (*African horse sickness virus*, AHSV) et du virus de la fièvre catarrhale ovine (*Bluetongue virus*, BTV). Ce dernier est l'orbivirus le plus étudié et est considéré comme l'espèce prototype pour caractériser les autres espèces du genre.

5.2 Structure et génome

Le BTV est un virus non enveloppé possédant une capsidie à symétrie icosaédrique d'environ 88 nm de diamètre. La particule virale a une masse molaire d'environ $120 \cdot 10^6$ Daltons (Da). Elle est constituée d'une capsidie externe, d'une capsidie interne et d'un génome composé de 10 segments d'ARN double brin (**Figure 7**).

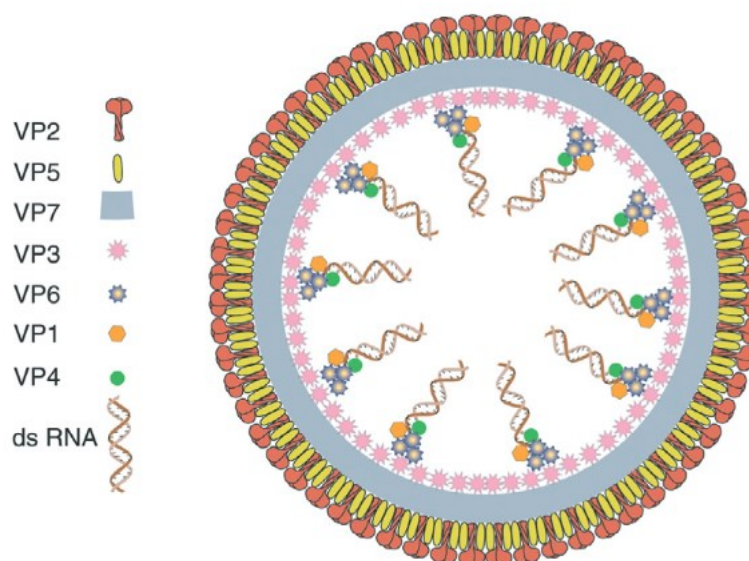


Figure 7 : Schéma représentant la particule virale du BTV.

Source : Schwartz-Cornil *et al.*[12].

5.2.1 Le génome

Le génome possède au total 19 200 paires de bases (pb) et est composé de 10 segments d'ARN double brin. Les segments sont numérotés de 1 à 10, du plus grand (3944 pb) au plus petit (822 pb) et sont présents en copie unique [47]. Ils codent pour 7 protéines structurales ; VP1 à VP7 et 5 voire 7 protéines non structurales, NS1 à NS3/NS3a, NS4 et NS5/NS5a (**Tableau 2**). Les segments 1 à 8

codent pour une unique protéine alors que les segments 9 et 10 peuvent coder pour deux protéines par un mécanisme de fuite d'initiation ou « *leaky scanning* » en anglais [48].

Les séquences des extrémités 5' et 3' des segments sont conservées, ces séquences sont respectivement 5'-GUUAAA-3' et 5'-ACUUAC-3'. L'ensemble des extrémités 5' des ARN double brin ainsi que celles de l'ensemble des transcrits viraux possèdent une coiffe méthylée, tandis que l'extrémité 3' n'est pas polyadénylée [14].

Tableau 2 : Organisation génomique des 10 segments du BTV et caractéristiques des protéines codées.

aa : acides aminés / kDa : kiloDaltons

Segment	Nombre paire de bases	Protéine codée	Taille protéine (aa/kDa)	Caractéristique	Fonctions connues de la protéine
1	3944	VP1	1302/150	Protéine mineure de la capsid interne	ARN polymérase ARN dépendante
2	2939	VP2	950 à 962/111	Protéine de la capsid externe	Ligand du récepteur cellulaire, antigène protecteur, entrée du virus, spécificité de type
3	2772	VP3	901/103	Protéine majeure de la capsid interne	Interaction avec complexe de réplication, avec ARN génomique et avec VP7
4	1981	VP4	644/75	Protéine mineure de la capsid interne	Enzyme de coiffe : guanylyltransferase, guanine-N7-méthyltransferase, ARN 5' triphosphatase, NTPase
5	1776	NS1	552/64	Protéine non structurale	Forme des tubules, favorise la synthèse des protéines virales
6	1637	VP5	526/59	Protéine de la capsid externe	Perméabilise les membranes, spécificité de type
7	1156	VP7	349/38	Protéine majeure de la capsid interne	Forme la surface de la capsid interne, entrée du virus dans les cellules du culicoïde
8	1125	NS2	354/40	Protéine non structurale	Protéine phosphorylée, recrute les ARN viraux, forme les corps d'inclusion viraux, NTPase
9	1049	VP6	330/35	Protéine mineure de la capsid interne	Hélicase, ATPase
		NS4	77 à 79/9.5	Protéine non structurale	Antagoniste de la voie IFN, inhibe la transcription cellulaire, interagit avec STAT1
10	822	NS3-NS3a	229-216/24	Protéine non structurale	Permet la sortie du virus, antagoniste de la voie IFN, active la voie MAPK/ERK, interagit avec VP2 et VP5, Tsg101, calpactine, BRAF, STAT1/2, OPTN
		NS5-NS5a	59-50/7.5	Protéine non structurale putative	Localisation nucléolaire et inhibition de la transcription cellulaire

5.2.2 La capsid externe

La capsid externe est composée des protéines structurales VP2 et VP5. Les protéines VP2 (111 kilodaltons, kDa) et VP5 (59 kDa) se trimérisent et s'organisent respectivement en « triskelion » et en motifs globulaires. Soixante trimères de VP2 s'assemblent à 120 trimères de VP5 pour former la

capside externe. VP2 et VP5 sont les protéines du BTV possédant les séquences les plus variables. VP2 est celle qui induit la production d'anticorps neutralisants chez l'hôte, elle est donc soumise à une pression de sélection ce qui induit une plus forte variabilité [47]. Bien qu'elle soit plus conservée, la séquence de VP5 reflète l'origine géographique de la souche virale [12].

5.2.3 La capsid interne

La capsid interne donne la structure icosaédrique à la particule virale et est structurée en deux couches. La couche intermédiaire est composée de VP7 (38 kDa) organisée en 260 trimères. La couche inférieure est composée de la protéine structurale VP3 (100 kDa) organisée en 12 décamères [49]. Cette couche inférieure abrite les 10 segments du génome viral ainsi que 3 protéines structurales minoritaires, VP1, VP4 et VP6. Ensemble, ces 3 protéines forment le complexe de transcription et de réplication. VP1 (149 kDa) possède la fonction d'ARN polymérase-ARN dépendante, VP4 (74 kDa) est l'enzyme de coiffe des ARN et VP6 (36 kDa) est l'hélicase des ARN double brin.

5.3 Cycle de réplication

Le cycle de réplication du BTV se déroule de manière classique en 4 phases : l'entrée du virus dans la cellule, la réplication, l'assemblage et enfin la sortie de la cellule (**Figure 8**). Ce cycle est rapide dans les cellules de mammifères et, des particules formées de novo sont détectables 8 à 10 heures après inoculation [1].

5.3.1 Entrée du virus par endocytose

La protéine structurale VP2 permet l'attachement du virus à la cellule hôte par liaison aux glycoprotéines de surface. Cette liaison induit l'entrée du virus par une endocytose clathrine-dépendante. L'acidification de l'endosome induit un changement conformationnel de la capsid externe. Tout d'abord, VP2 se dissocie de la particule virale puis VP5 fusionne avec la membrane endosomale. Le cœur de la particule virale est alors libéré dans le cytoplasme et devient transcriptionnellement actif [49].

Dans la cellule du vecteur culicoïde, l'attachement du virus à la surface cellulaire serait directement médié par la protéine de la capsid interne VP7 [1].

5.3.2 Réplication cytoplasmique du virus

Le cœur libéré dans le cytoplasme est composé de la capsid interne (VP7 et VP3), du complexe de réplication (VP1, VP4 et VP6) et des 10 segments d'ARN double brin génomiques.

La réplication du BTV est assurée par le complexe de réplication. La protéine VP6 possède une fonction hélicase qui permet de dérouler les ARN double brin du génome viral. Ceux-ci peuvent alors être transcrits en ARN viraux simple brin par la protéine VP1 qui est l'ARN polymérase-ARN dépendante. Les ARN messagers viraux sont alors coiffés à l'extrémité 5' par la protéine VP4 qui possède une activité guanylyltransférase et guanine-N7-méthyltransférase [50]. Dans le cœur, chaque segment est transcrit et modifié à plusieurs reprises par le complexe de réplication. Les ARN simple brin ainsi générés et coiffés sont libérés dans le cytosol. Ces transcrits serviront plus tard de matrice pour générer de nouveau le génome viral d'ARN double brin. Cependant, dans un premier temps, ils servent d'ARN messagers (ARNm) pour leur traduction par la machinerie cellulaire de l'hôte

aboutissant à l'expression des 7 protéines structurales, VP1 à VP7 et de 5 voire 7 protéines non structurales, NS1 à NS3/NS3a et NS4-NS5/NS5a (**Tableau 2**) [49].

Parmi ces protéines non structurales, NS1 (64 kDa) est synthétisée précocement dans le cytoplasme des cellules infectées où elle forme des tubules. Elle agit comme un régulateur positif de l'expression des gènes viraux en favorisant leur traduction de manière préférentielle par rapport aux gènes cellulaires grâce à son interaction avec la séquence conservée ACUUAC des extrémités 3' non polyadénylée des ARNm viraux [51].

5.3.3 *Assemblage dans les corps d'inclusion viraux*

La formation de corps d'inclusion viraux dans le cytosol est caractéristique de l'assemblage des nouvelles particules de BTV. Cette formation est médiée par NS2, protéine phosphorylée de 42 kDa, qui en est le composant principal [52]. Elle permet le recrutement des ARN viraux simple brin et des protéines VP1, VP4 et VP6 nouvellement synthétisées. VP3 vient ensuite s'auto-assembler avec VP1, VP4 et VP6. VP7 s'ajoute ensuite aux particules néo-formées par l'intermédiaire de VP3 et permet leur stabilisation.

NS2 recruterait spécifiquement chacun des 10 transcrits d'ARN viral en se liant à des structures secondaires spécifiques à chaque segment [53]. Au vu de la petite taille de NS2, il est également possible qu'elle ne recrute que certains segments, qui eux formeraient des liaisons ARN-ARN avec les autres segments [50]. Par son activité ARN polymérase, VP1 synthétise alors les brins complémentaires, assurant à la nouvelle particule de contenir le génome viral complet.

La phosphorylation de NS2 semble réguler la libération des particules néo-formées dans le cytoplasme. C'est alors que VP2 et VP5 situées à proximité des corps d'inclusion vont s'attacher à la particule par liaison avec VP7. La formation de cette capsid externe rend les particules transcriptionnellement inactives mais matures pour leur sortie de la cellule [49].

5.3.4 *Libération du virus par bourgeonnement ou par lyse cellulaire*

La libération des nouvelles particules de BTV se produit par lyse cellulaire ou par bourgeonnement et implique trois protéines du BTV : VP2, VP5 et NS3.

VP2 interagit avec la protéine cellulaire vimentine qui est un des composants majeurs des filaments intermédiaires du cytosquelette. De plus, la protéine NS3 (24 kDa) est capable d'interagir simultanément avec VP2 et une protéine du complexe calpactine. Ce complexe est impliqué dans l'adressage des protéines à la membrane plasmique. VP2 et NS3 permettent ainsi le trafic de la particule virale du cytoplasme vers la membrane plasmique [50]. En outre, ce trafic des particules virales est renforcé par la capacité des VP2, VP5 et NS3 à interagir avec les domaines lipidiques des membranes vésiculaires et plasmiques [50]. Au niveau de la membrane plasmique, NS3 facilite la libération du virus par bourgeonnement en interagissant avec une protéine de la voie ESCRT, Tsg101 [54].

Par ailleurs, NS3 serait également capable d'agir comme une viroporine pour moduler la libération du virus par la voie de bourgeonnement ou par la voie de lyse cellulaire [12]. Les mécanismes de sortie du virus par lyse cellulaire ne sont pas encore bien décrits mais sembleraient être liés au taux d'expression de NS3. Cette voie de sortie n'a pas lieu dans le cycle de réplication viral chez le vecteur culicoïde [50].

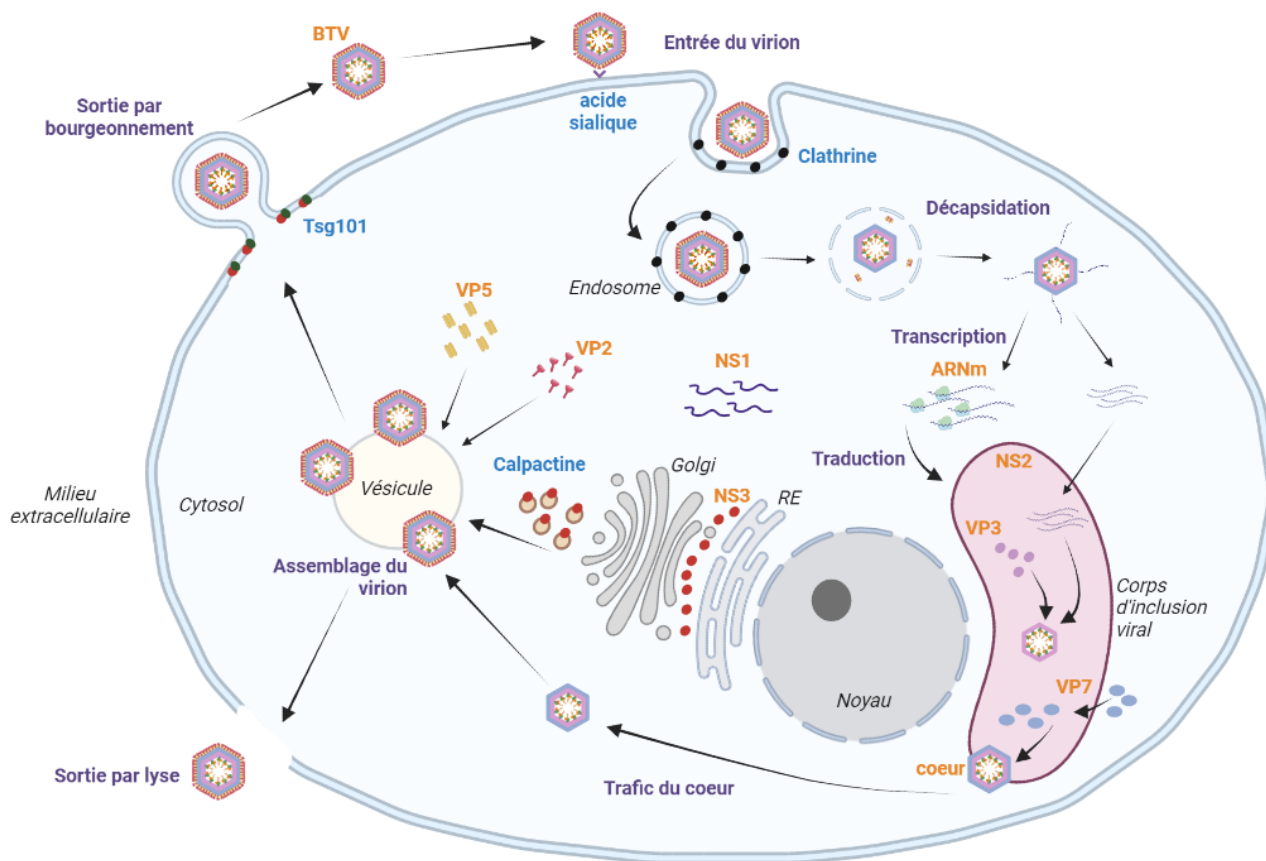


Figure 8 : Schéma du cycle de réplication du virus de la fièvre catarrhale ovine.

Réalisé avec Biorender (<https://app.biorender.com/>) d'après Patel et Roy [50].

6. Protéines non structurales du virus de la FCO

Au-delà de leur rôle dans le cycle de réplication, les protéines non structurales d'un virus sont souvent impliquées dans les mécanismes d'échappement à la réponse antivirale de l'hôte. Dans cette partie, les fonctions et les caractéristiques connues des protéines non structurales du virus de la FCO sont décrites.

6.1 Les protéines NS1 et NS2 : essentielles à la réplication

Comme décrit dans la [section 5.3](#), les protéines NS1 et NS2 sont essentielles à la réplication du virus de la fièvre catarrhale ovine.

Dans la cellule infectée par le BTV, NS1 existe sous deux formes : tubulaire et non tubulaire. C'est la forme non tubulaire de NS1 qui régule positivement la traduction des ARNm du virus et qui est nécessaire à la réplication virale [55]. La protéine NS1 est composée de 552 acides aminés (aa). Sa structure est constituée d'hélices alpha et de feuillets beta. L'étude de sa structure tertiaire par cryomicroscopie électronique montre que chaque monomère de NS1 se compose d'un pied, d'un corps, d'une tête et d'un bras. La partie N-terminale correspond au pied et la partie C-terminale au bras qui lui, possède deux motifs en doigt de zinc [55]. La capacité à former des tubules est portée par la partie C-terminale de la protéine [55]. Bien que sous cette forme NS1 ne soit pas nécessaire pour favoriser la synthèse des protéines virales, la formation des tubules permet de réduire l'effet cytopathique

engendré par l'infection BTV. Sous sa forme tubulaire, NS1 jouerait donc, en plus, un rôle dans la pathogenèse cellulaire [56].

NS2 est composée de 354 aa et possède deux sites de phosphorylation dans sa partie C-terminale (Ser 249 et 259) [52]. Les domaines protéiques des résidus 2 à 11 et de 153 à 166 assurent la liaison aux ARN viraux [57,58]. NS2 permet l'assemblage des nouvelles particules virales et a été décrite dans la [section 5.3.3](#).

6.2 La protéine NS3 : un facteur de virulence important

Les protéines NS3 et NS3a codées par le segment 10 du virus ont été déterminées comme non essentielles à la réplication. Cependant, elles contribuent fortement au relargage du virus hors de la cellule infectée et il existe une pression de sélection pour qu'elles soient exprimées au cours de l'infection. Leur présence hautement conservée chez les virus du genre *Orbivirus* transmis par les culicoïdes prouve leur importance dans le processus de réplication [59].

La protéine NS3 est composée de 229 acides aminés et la protéine NS3a correspond à la forme raccourcie de NS3 délétée des 13 premiers aa du côté amino-terminal [60]. NS3 possède deux domaines transmembranaires, un domaine extracellulaire, deux domaines de glycosylation, ainsi que deux motifs appelés « *Late domain* » [59]. Ces derniers correspondent à des courtes séquences de type PXXP, PPXY qui sont retrouvées dans diverses protéines virales impliquées dans la libération des particules virales en fin de cycle, d'où le nom de domaine tardif [61]. C'est cette structure qui permet à NS3 d'interagir avec les différents composants cellulaires ou viraux pour faciliter la libération du virus par bourgeonnement ou par lyse cellulaire ([section 5.3.4](#)). NS3 est la seule protéine membranaire du BTV, elle se localise au niveau de la membrane cytoplasmique, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique [60] (**Figure 9**).

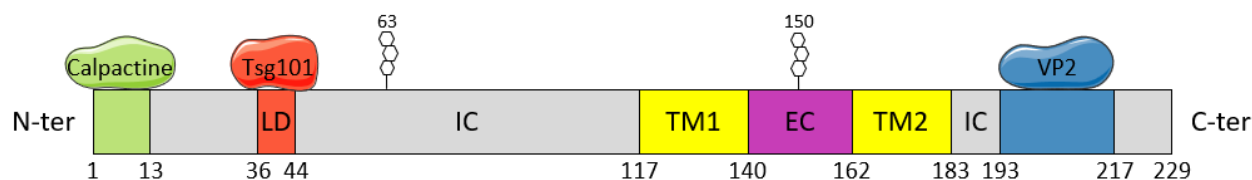


Figure 9 : Représentation schématique de la protéine NS3 du BTV.

NS3 possède différents domaines : un *late domain* (LD, rouge) dont la séquence en acides aminés est 5'-PPRYAPSAP-3' et est responsable de l'interaction avec Tsg101, des domaines intracytoplasmiques (IC, gris), deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2, jaune) et un domaine extracellulaire (EC, violet). La NS3 se lie au complexe calpactine grâce à son domaine N-terminal (vert) et à la protéine VP2 du BTV par son domaine C-terminal (bleu). NS3 possède deux sites prédits de glycosylation, un en position 63 et l'autre en position 150. Les chiffres correspondent à la position des acides aminés.

6.2.1 NS3 module la pathogenèse cellulaire et la réplication virale

La cinétique de réplication du BTV chez l'hôte mammifère peut être modifiée en fonction du taux d'expression de la protéine NS3 dans la cellule. Ce taux d'expression varie selon la séquence de la protéine NS3 et plus exactement en fonction de l'acide aminé situé en position 24. Il a été démontré que la présence d'une proline à cette position engendrait une plus forte dégradation de NS3 par le protéasome dans les cellules ovines CPT-Tert (*Choroïde Plexus-antigène T du SV40-Human Telomerase Reverse Transcriptase*) par rapport à une NS3 possédant une leucine. Cette différence de

dégradation n'a pas été observée en cellules de culicoïdes KC (dérivées de cellules de *C. sonorensis*). Dans des cellules infectées par les virus BTV-1 et BTV-16 dont la NS3 possède une leucine en position 24, le taux d'expression de cette protéine virale était plus élevé que dans des cellules infectées par le BTV-2 dont la NS3 possède une proline. Une expression plus forte de NS3 a eu pour conséquence d'augmenter l'effet cytopathique et le titre viral. Dans un modèle murin, le remplacement de la leucine par une proline en position 24 de la NS3 dans le virus BTV-1 a engendré une atténuation du virus [62]. Ces données montrent que la variabilité génétique de NS3 module la cinétique de réplication du BTV chez l'hôte mammifère.

6.2.2 NS3 inhibe la réponse immunitaire innée en amont de la synthèse d'interféron

Suite à l'entrée du virus, la réponse immunitaire de la cellule est basée sur la reconnaissance de motifs viraux comme du non-soi (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) par des récepteurs cellulaires (*pattern recognition receptors*, PRR) [63].

Le BTV n'échappe pas à la règle et induit une réponse immunitaire de la cellule infectée. Les ARN viraux libérés dans le cytoplasme au cours de l'infection sont reconnus par les PRR cytosoliques RIG-I et MDA5 (*Retinoic acid-Inducible Gene 1* et *Melanoma Differentiation Associated Protein 5*). La reconnaissance de ces éléments induit l'activation de la voie de signalisation des interférons de type I. Cette activation passe notamment par la poly-ubiquitination des protéines kinases IKK ϵ et TBK1 (*Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase subunit Epsilon* et *Tank Binding Kinase 1-binding protein 1*) qui vont induire la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (*Interferon Regulatory Factor*). Ces facteurs vont alors se transloquer au noyau où ils activent la transcription des gènes codant pour les interférons de type I ou IFN- α et IFN- β . Ceci correspond à la première ligne de défense mise en place par la cellule hôte contre l'infection par BTV (**Figure 10**) [64].

Pour contrecarrer cette réponse antivirale, le BTV met en place des mécanismes d'échappement. La protéine NS3 a été identifiée comme le facteur principal de la modulation de cette réponse immunitaire innée [64]. En effet, NS3 interfère avec la voie de synthèse des IFN en aval de la reconnaissance des PAMPs par l'ARN-hélicase RIG-I et en amont de l'activation des protéines IKK ϵ /TBK1 de la voie IRF. Il a été montré que dans des cellules où la voie IRF était stimulée par une forme constitutivement active de RIG-I, l'expression de NS3 bloquait la phosphorylation d'IRF3 et par conséquent la synthèse d'IFN. A l'inverse, la stimulation de la voie au niveau de IKK ϵ ne permettait pas ce blocage par NS3 [65]. En complément, il a été démontré que NS3 pouvait inhiber l'activation de TBK1 en s'associant, au niveau de l'appareil de Golgi, avec sa protéine activatrice, l'optineurine (OPTN). Cette interaction entre NS3 et OPTN concurrencerait l'interaction entre l'OPTN et TBK1. Cette dernière serait alors moins activée, entraînant l'inhibition de la phosphorylation d'IRF3 et par conséquent sa translocation au noyau et l'inhibition de la transcription du gène codant pour l'IFN- β [66].

6.2.3 NS3 inhibe la réponse immunitaire innée en aval de la synthèse d'interféron

Les interférons de type I synthétisés et sécrétés par les cellules infectées vont permettre la mise en place d'une seconde ligne de défense contre l'infection virale. Les IFN de type I vont se fixer sur leur récepteurs spécifiques IFNAR situés à la surface des cellules (infectées et non-infectées). Ceci active la voie de signalisation JAK/STAT par phosphorylation des protéines JAK (*Janus Kinase*) puis des protéines STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Les protéines STAT1 et

STAT2 phosphorylées se dimérisent et transloquent au noyau où elles induisent la transcription des gènes de réponse à l'IFN, les ISG (*Interferon stimulated genes*) (**Figure 10**). L'expression de ces ISG permet alors la lutte antivirale au sein de la cellule par différentes actions. Par exemple, ces cytokines inflammatoires peuvent induire la dégradation des ARNm, l'apoptose ou moduler la réponse immunitaire adaptative [67].

En plus d'inhiber la synthèse des IFN de type I, NS3 antagonise la réponse immunitaire de l'hôte en agissant également en aval de l'induction par les interférons. Tout d'abord, NS3 est capable de bloquer la phosphorylation de STAT1 inhibant ainsi sa translocation au noyau et l'expression des cytokines inflammatoires [68]. Ce blocage s'expliquerait par la capacité de NS3 à interagir avec le domaine SH2 de STAT1, phénomène qui serait favorisé en présence de la protéine virale NS4 (section 6.3.7) [69]. D'autre part, NS3 est capable d'interagir avec STAT2 pour induire sa dégradation par un mécanisme dépendant de l'autophagie et de la poly-ubiquitination de NS3 en position K63 par une E3-Ub-ligase [70].

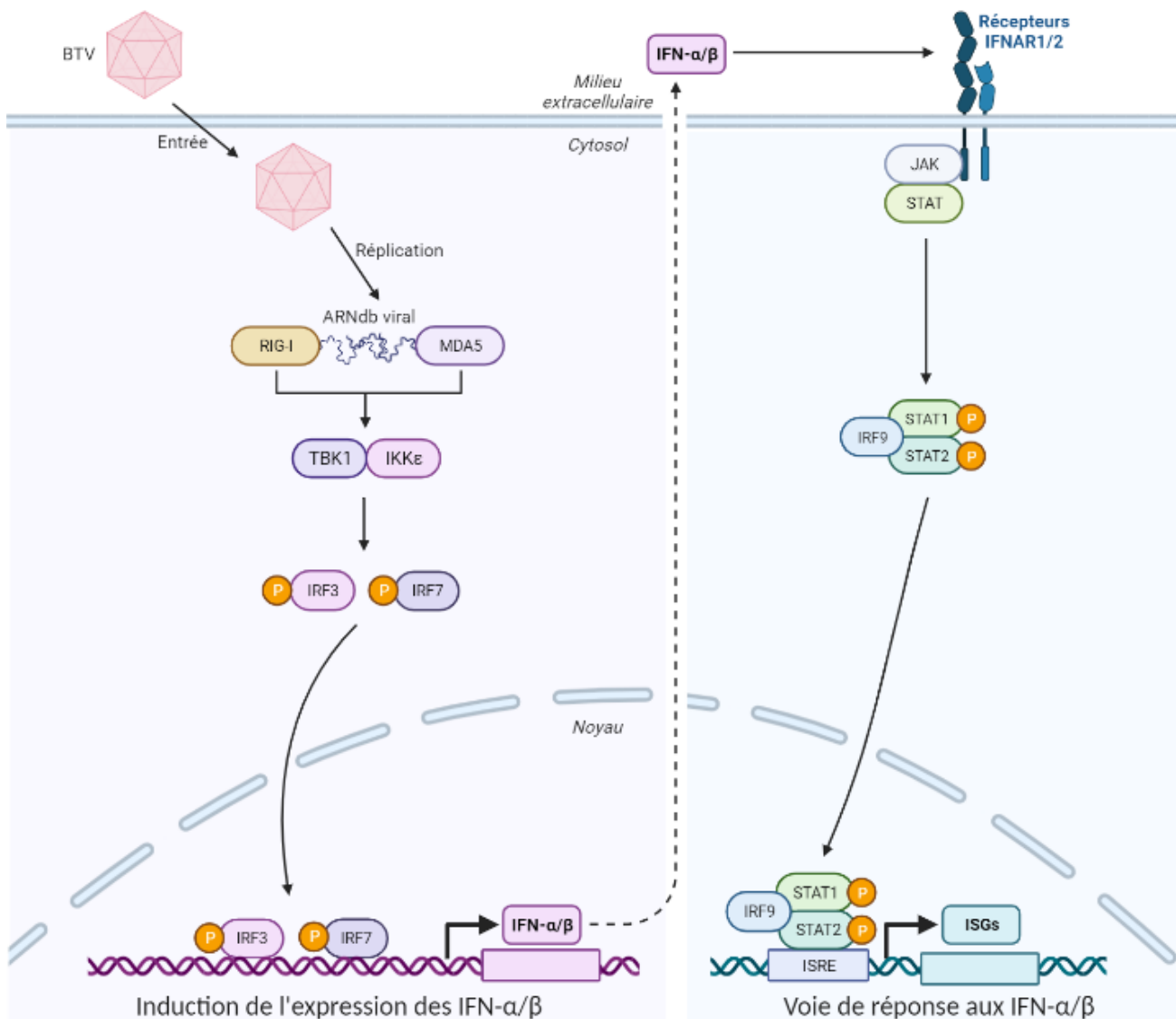


Figure 10 : Schéma simplifié de l'activation de la voie des interférons suite à l'infection par BTV.
Réalisé avec Biorender (<https://app.biorender.com/>)

6.2.4 NS3 active la voie de signalisation MAPK/ERK

En plus de son rôle antagoniste sur la voie des interférons de type I, il a été démontré que NS3 était capable d'activer la voie de signalisation MAPK/ERK (*Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase*) dans des cellules humaines HEK293T préalablement cultivées sans facteur de croissance. L'activation de cette voie serait médiée par l'interaction entre NS3 et la protéine cellulaire BRAF, une des protéines de la cascade de signalisation. Cette activation permettrait d'augmenter l'efficacité de réplication du BTV [71]. Chez les mammifères, la voie de signalisation MAPK/ERK est impliquée dans de nombreux processus comme la prolifération, la différenciation mais également la mort cellulaire [72]. Elle est aussi une des voies de la réponse immunitaire activant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires [73]. Contre-intuitivement, son activation pourrait engendrer une trop forte réponse inflammatoire et provoquer des lésions cellulaires contribuant à la pathogenèse du BTV [71].

En résumé, les multiples fonctions portées par la protéine NS3 en font un facteur de virulence important pour le BTV. Elles montrent également la diversité des mécanismes d'échappement mis en place par le virus pour contrer la réponse immunitaire innée de l'hôte.

6.3 La protéine NS4 : un facteur de virulence nucléolaire

6.3.1 Séquence codante et conservation dans le génome

La première description du cadre de lecture putatif codant (*Open Reading frame* ou ORF) pour NS4 a été faite par Firth en 2008 [74]. Par analyse bio-informatique, le cadre de lecture chevauchant celui codant pour la VP6 a été mis en évidence sur le segment 9 des orbivirus BTV, EHDV, AHSV, PHSV (*Peruvian horse sickness virus*), YUOV (*Yunnan orbivirus*), PALV (*Palyam virus*) et GIV (*Great Island virus*). Cet ORF n'est cependant pas conservé chez le virus *Saint Croix River* (SCRV) [74,75].

La traduction de ce cadre de lecture alternatif serait possible grâce à une fuite d'initiation (*leaky scanning*) lors de la traduction de l'ORF situé en amont et grâce à la présence d'un contexte Kozak fort autour de son codon initiateur [74,76]. Chez le virus de la FCO, ce cadre de lecture code, selon les souches, pour une protéine d'une taille comprise entre 77 et 79 aa faisant environ 10 kDa. Sa séquence est présente chez tous les sérotypes et est hautement conservée entre les souches [77].

6.3.2 Caractéristiques de la protéine

Les analyses bio-informatiques ont également permis de prédire des domaines structuraux et fonctionnels de NS4. Celle-ci présente une séquence composée de résidus principalement basiques dans sa partie amino-terminale (résidus 3 à 20) lui prédisant une localisation nucléaire. Deux hélices alpha et un motif *leucine zipper* composent la structure secondaire de la protéine [77]. NS4 possède un domaine *coiled-coil* entre les résidus 27 et 77 et enfin, un motif de liaison à l'ADN est prédit entre les positions 14 et 54 [75] (**Figure 11**).

L'expression de NS4 au cours de l'infection a été prouvée expérimentalement. Elle a été pour la première fois détectée par *western blot* à l'aide d'un anticorps spécifique dans des lysats de cellules de hamster BSR (cellules dérivées des cellules BHK) infectées par le BTV-1 et le BTV-8 [77]. Elle a aussi été détectée dans des cellules BHK-21 (*Baby hamster kidney*) et des cellules KC infectées par le

BTV-8 [75]. En revanche, la protéine n'a pas été détectée dans la fraction virale suggérant que NS4 est absente du virion [77].

D'autre part, dans des cellules bovines *Bovine fetal aorta endothelium* (BFAE) infectées par le BTV-1, NS4 a été détectée précocement au cours de l'infection, et au même moment que les protéines NS2 et NS3 [77]. L'étude de sa cinétique d'expression par microscopie confocale a permis de mettre en évidence la localisation nucléaire et principalement nucléolaire de NS4 dès 2 heures post-infection et ceci au moins durant 24 heures. Cette localisation nucléolaire a également été mise en évidence 24 heures après l'infection de cellules BSR par le BTV-1 et le BTV-8 [77], mais aussi dans des cellules BHK-21 infectées par le BTV-8 où NS4 a été montrée colocalisant avec la fibrillarine [75]. Dans les cellules de moustiques C6/36, NS4 a présenté une localisation nucléaire mais pas nucléolaire 48 h après infection par BTV-1 et BTV-8 [77]. Par transfection de cellules ovines CPT-Tert avec un plasmide codant pour la NS4 du BTV-8 sauvage ou pour différents mutants de NS4 fusionnés à la GFP, la partie N-ter et plus précisément les résidus 7 à 12 ont été montrés comme essentiels pour la localisation nucléaire et nucléolaire de NS4 (**Figure 11**) [77]. Le nucléole est considéré comme un compartiment dynamique au sein du noyau où les sous-unités des ribosomes sont synthétisées avant d'être transportées vers le cytoplasme [78]. De plus, le nucléole contient des protéines associées à la réparation et à la réplication de l'ADN, ainsi qu'au contrôle du cycle cellulaire. Des micro ARN sont également présents dans le nucléole et pourraient bloquer la sortie des ARNm du noyau pour leur traduction [79].

Dans une autre étude, une évolution de la localisation de NS4 dans des cellules BHK-21 infectées par le BTV-8 a été évaluée par microscopie confocale. Quatre heures après l'infection, NS4 était présente dans le cytoplasme où elle colocalisait avec les gouttelettes lipidiques. A 24 heures post-infection, NS4 était présente de manière ponctiforme au cytoplasme et au noyau. Enfin, 72 heures après l'infection, NS4 a été visualisée au niveau de la membrane plasmique [75]. Ces résultats suggèrent que NS4 possède une localisation majoritairement nucléaire et surtout nucléolaire mais qu'elle pourrait, selon les conditions expérimentales et du temps d'infection, se retrouver dans d'autres compartiments cellulaires.

Chez l'orbivirus AHSV, il existe deux isoformes de la protéine NS4, appelées NS4-I et NS4-II respectivement de 144 et de 154 aa. Il a été démontré que ces deux isoformes avaient une localisation cytoplasmique et nucléaire. Dans le noyau, ces NS4 ne sont pas présentes au nucléole mais se localisent plus spécifiquement au niveau des PML-NB (*promyelocytic leukemia-nuclear bodies*) [80]. Ces corps nucléaires sont d'une part impliqués dans la maintenance du génome de la cellule et d'autre part, pourraient jouer un rôle dans la réponse immunitaire antivirale [81,82].

La capacité de NS4 à se localiser dans le compartiment nucléaire alors que le BTV est un virus à réplication cytoplasmique ne semble pas fortuite sachant que le compartiment nucléaire peut être une cible dans la stratégie d'échappement mis en place par les virus pour contrer la réponse cellulaire antivirale [83].

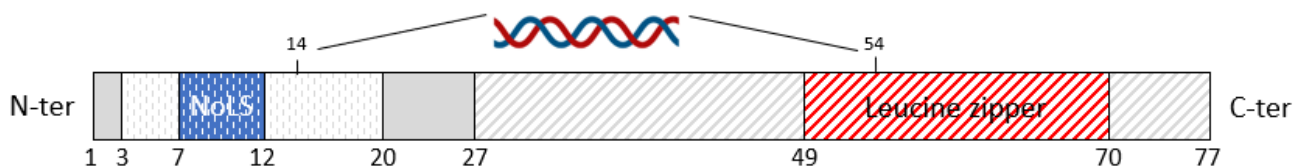


Figure 11 : Représentation schématique de la protéine NS4 du BTV.

NS4 possède un domaine riche en résidus basiques (carré à pointillés) lui prédisant une localisation nucléaire. Au sein de ce domaine, les résidus 7 à 12 (bleu) sont essentiels pour sa localisation nucléolaire (NoLS). Un large domaine de type *coiled-coil* est prédit entre les résidus 27 à 77 (hachuré) et comporte un motif *leucine zipper* (rouge). La liaison de NS4 avec l'ADN double brin se ferait via la région comprise entre les aa 14 et 54. Les chiffres correspondent à la position des acides aminés.

6.3.3 NS4 est capable de se lier à l'ADN double brin

La séquence comprise entre les acides aminés 14 et 54 est prédite pour donner à la protéine NS4 la capacité à interagir avec les acides nucléiques. Afin de vérifier expérimentalement cette hypothèse, des essais de protection d'ARN double brin et d'ADN double brin ont été réalisés. Le principe de cette méthode réside sur le fait que la liaison d'une protéine à l'acide nucléique le protège de la dégradation par une nucléase. Par cette approche, il a été mis en évidence qu'en présence de NS4, les ADN double brin étaient protégés de la dégradation par la DNase I alors que les ARN étaient dégradés par la RNase Dicer. La protéine NS4 du BTV est donc capable de se lier aux ADN double brin mais pas aux ARN double brin [75].

En ce qui concerne les autres orbivirus, la NS4 de GIV est capable de lier à la fois les ARN et les ADN double brin [75] tandis que la NS4 d'AHSV peut se lier uniquement aux ADN double brin [84].

6.3.4 NS4 n'est pas essentielle à la réplication virale

Des souches de BTV-1 et BTV-8 délétées de l'ORF codant pour la NS4 ont été obtenus par génétique inverse. Leur cinétique de réplication a été évaluée en comparaison avec les virus sauvages parentaux en cellules BSR, BFAE, CPT-Tert, C6/36 et KC. Dans ces cellules, les virus parentaux et délétés de l'ORF NS4 montrent la même courbe de réplication. Ces résultats suggèrent donc que, *in vitro*, NS4 n'est pas essentielle à la réplication du BTV. En outre, les souches BTV-1 et BTV-8 sauvages ou dépourvues de NS4 (BTV Δ NS4) ont engendré la même mortalité chez deux lignées murines immunodéficientes, des souris IFNAR $^{-/-}$ (déficientes en récepteur à l'interféron de type I), et des souris NIH-Swiss. Ces résultats suggèrent que NS4 ne participerait pas, dans ces modèles *in vivo*, à la pathogénicité du virus [77].

6.3.5 NS4 donne un avantage de réplication dans les cellules interféron-compétentes

Les cellules BSR et CPT-Tert ne possèdent pas un système de réponse innée intacte. Elles sont déficientes pour la production d'interféron cependant elles peuvent répondre à leur signal. Aussi, l'impact de NS4 dans des cellules interféron-compétentes infectées par le BTV a été étudié.

Dans un premier temps, des cellules ovines CPT-Tert ont été traitées à l'interféron avant d'être infectées par les BTV-1 et BTV-8 sauvages ou délétés de la NS4. Dans ces cellules pré-traitées à l'IFN, les souches BTV Δ NS4 ont engendré un effet cytopathique moins important par rapport aux virus sauvages. La cinétique de réplication met en évidence un titre viral diminué dans les cellules infectées avec le BTV-8 Δ NS4 par rapport au BTV-8 sauvage. Aucune différence n'a cependant été observée

pour le BTV-1. Pour comprendre pourquoi l'absence de NS4 n'avait un impact que pour le BTV-8, un virus recombinant BTV-8 comportant le segment 9 du BTV-1 (BTV-8/1S9) et un virus recombinant BTV-1 comportant le segment 9 du BTV-8 (BTV-1/8S9) ont été obtenus par génétique inverse. Le titre viral était augmenté dans les cellules infectées avec le BTV-8/1S9 par rapport au BTV-8 sauvage et aucune différence n'a été observée entre le BTV-1 sauvage et le BTV-1/8S9. La NS4 du BTV-1 et du BTV-8 dont les séquences ne diffèrent qu'au niveau du résidu 6, donnent toutes les deux un avantage de répllication dans les cellules CPT-Tert pré-traitées à l'interféron dans le contexte du BTV-8 entier. Cela suggère que NS4 conférerait un avantage à la répllication virale dans ces cellules mais qu'il existerait d'autres facteurs viraux également impliqués dans cet effet [77].

En complément, la cinétique de répllication du BTV-8 délété de la NS4 a été étudiée dans des cellules ovines et humaines interféron-compétentes. Ainsi l'infection de cellules primaires ovines ovEC (*Ovine aortic endothelial* [85]) et de cellules humaines A549 a confirmé l'avantage de répllication donné par l'expression de NS4. En outre, cet avantage de répllication fourni au BTV-8 a été observé chez l'un des hôtes naturels du virus, le mouton. En effet, les animaux infectés par un BTV-8 Δ NS4 n'ont pas présenté de fièvre contrairement à ceux infectés avec le virus parental et ont présenté une virémie retardée et significativement plus faible. La protéine NS4 s'avère être un facteur de virulence pour le BTV-8 chez son hôte naturel [86].

6.3.6 NS4 antagonise la réponse immunitaire médiée par les interférons

L'avantage de répllication donné au BTV par NS4 dans des cellules interférons-compétentes suggère que la protéine virale pourrait moduler cette voie de l'immunité innée.

C'est pourquoi la capacité de NS4 à inhiber la synthèse d'IFN a été étudiée par un essai de protection à l'IFN. Des cellules interféron-compétentes ovEC ont été infectées avec un BTV-8 sauvage ou un BTV8 Δ NS4. Seize heures après l'infection, les surnageants de culture ont été récoltés et traités aux UV afin d'inactiver les virus. Ces surnageants ont ensuite été déposés sur des cellules CPT-Tert qui sont capables de répondre à la synthèse d'IFN mais pas d'en produire. Après 24 h d'incubation avec ces surnageants, les cellules CPT-Tert sont infectées par le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV). En l'absence d'IFN dans le surnageant, l'EMCV est capable de tuer les cellules CPT-Tert. En présence d'IFN, les cellules sont protégées de l'infection à l'EMCV. Aussi, le taux d'IFN présent dans les surnageants initiaux a été calculé par rapport au pourcentage de cellules mortes de l'infection à l'EMCV et ceci 48 h après infection. Les cellules ovEC infectées par le BTV-8 sauvage ont produit significativement moins d'IFN par rapport aux cellules infectées avec le virus délété de la NS4. La protéine NS4 pourrait donc inhiber soit la reconnaissance du virus par l'hôte, soit la transcription ou alors la synthèse d'interférons. Cependant, au cours de l'infection de cellules humaines interféron-compétentes A549 avec le BTV-8 sauvage ou le BTV8 Δ NS4, les facteurs de régulation IRF3 et NF- κ B ont montré un taux de translocation au noyau comparable. Aussi, NS4 ne semble pas empêcher l'activation de cette cascade de signalisation [86].

Par une approche de séquençage aléatoire du transcriptome entier (*RNA sequencing*, RNA-seq), les profils de transcription des ARN de cellules A549 infectées avec le BTV-8 sauvage ou le BTV-8 Δ NS4 ont été comparés. Une modulation de la transcription a été observée avec une centaine de gènes qui s'est avérée régulée négativement et environ 400 gènes positivement dans les cellules infectées par le BTV-8 sauvage par rapport aux cellules infectées par le BTV-8 Δ NS4. Parmi la centaine de gènes

dont la transcription cellulaire est inhibée en présence de NS4, les gènes de la réponse immunitaire innée sont rationnellement les plus impactés [86].

En aval de la reconnaissance du virus par la cellule hôte, NS4 du BTV antagonise la voie de réponse médiée par les interférons en inhibant la transcription de ses gènes.

6.3.7 NS4 collabore avec NS3 pour bloquer la voie de signalisation JAK/STAT

Comme déjà évoqué dans la section 6.2.3, NS4 favorise le blocage de la voie de signalisation JAK/STAT médié par la protéine NS3 [69].

Par une approche de co-immunoprécipitation à partir de lysats de cellules humaines HEK293 surexprimant la NS4 fusionnée à une étiquette HA et STAT1 fusionné à une étiquette Flag, il a été montré que NS4 était capable d'interagir avec STAT1. Une interaction directe entre ces deux protéines a été mise en évidence par GST *pull-down*, ainsi qu'entre NS3 et STAT1 [69].

En outre, des formes tronquées de STAT1 ont été testées en interaction avec NS3 et NS4 par co-immunoprécipitation et par une méthode de ligature de proximité (*Proximity Ligation Assay*, PLA). Les formes qui ne possédaient plus la partie C-terminale de STAT-1, correspondant à un domaine SH2, n'étaient plus capable d'interagir avec les deux protéines virales. Ce domaine pourrait ainsi être responsable de l'interaction qui semble avoir lieu dans le cytoplasme. Le domaine SH2 est important pour la phosphorylation de STAT1 ainsi que pour son hétérodimérisation avec STAT2. La phosphorylation de STAT1 a été étudiée dans des cellules pré-traitées aux IFN et surexprimant NS3 et/ou NS4. Ainsi, NS3 seule s'est révélée capable d'inhiber la phosphorylation alors que NS4 exprimée seule en a été incapable. En revanche, en co-expression des deux protéines virales, NS4 accentue l'action de NS3 [69]. De plus, il a été démontré que la co-expression de NS3 et NS4 dans ces cellules pré-traitées inhibait l'interaction entre STAT1 et STAT2 ainsi que la transcription des gènes ISG54 et 56 normalement exprimées en réponse à l'activation de la voie JAK/STAT [69].

NS3 et NS4 collaboreraient donc pour cibler le domaine SH2 de STAT1. Ceci aurait pour conséquence d'inhiber la phosphorylation de STAT1 et sa dimérisation avec STAT2. Sa translocation au noyau étant ainsi perturbée, la transcription des gènes ISG se retrouverait inhibée. En collaboration avec la protéine NS3, NS4 du BTV s'avère donc être un antagoniste de la voie de signalisation JAK/STAT.

Cette capacité à bloquer la phosphorylation de STAT1 est partagée par la NS4 de l'AHSV. En effet, dans des cellules pré-traitées aux IFN et infectées par une souche AHSV-5 sauvage, la phosphorylation de STAT-1 est inhibée et sa translocation nucléaire est bloquée. Cette inhibition n'a pas été observée lorsque les cellules ont été infectées par l'AHSV-5 délété de la protéine NS4. NS4 d'AHSV paraît ainsi essentielle pour le blocage de la réponse immunitaire médiée par la voie JAK/STAT [87].

6.3.8 NS4 inhibe la transcription cellulaire de manière globale

Afin de déterminer si l'inhibition de la transcription était spécifique aux gènes de l'immunité innée ou plus globale, un essai de gène rapporteur luciférase en cellules CPT-Tert a été réalisé. La co-transfection d'un plasmide codant pour la NS4 et un plasmide codant pour la *firefly luciferase* sous contrôle des promoteurs CMV, ISRE ou IFN- β a montré que NS4 réduisait l'expression de la luciférase de manière indépendante du promoteur. NS4 étant aussi capable d'inhiber l'expression de gène sous

le contrôle du promoteur CMV, ce blocage transcriptionnel ne semble donc pas spécifique de la voie des interférons mais serait plutôt global. Ensuite, la même approche a été utilisée avec un mutant de NS4 ne se localisant plus au nucléole. Son expression en cellules CPT-Tert n'a pas permis d'inhiber l'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur CMV. La capacité de NS4 à inhiber la transcription cellulaire semble donc liée à sa localisation nucléolaire [86].

Par ailleurs, le marquage des protéines nouvellement synthétisées dans des cellules ovEC non infectées ou infectées avec le BTV-8 sauvage ou délété de NS4 a montré que, dans les deux conditions d'infection, la synthèse protéique était largement diminuée. Bien qu'elle y contribue, NS4 n'est pas le seul facteur viral responsable de l'inhibition de la synthèse protéique [86].

En outre, aucune inhibition de l'expression de la *firefly luciferase* n'a été observée dans des cellules CPT-Tert co-transfectées avec un ARN codant la *firefly luciferase* et un plasmide codant NS4. Ceci suggère donc que NS4 ne bloque pas la traduction protéique et que sa capacité d'inhibition n'a lieu qu'au niveau transcriptionnel. Enfin, les données de RNA-seq n'ont pas montré de modifications de l'épissage des ARN entre les cellules infectées par le BTV-8 sauvage ou dépourvu de NS4. Celle-ci ne semblerait donc pas moduler l'expression des gènes à cette étape [86].

NS4 module donc la transcription cellulaire en étant capable de moduler négativement les niveaux des ARN messagers sans affecter leur épissage ni leur traduction.

6.4 Les protéines NS5 et NS5a : leur expression est encore putative

6.4.1 Séquence codante et conservation dans le génome

Comme le segment 9 codant pour les protéines VP6 et NS4, le segment 10 du génome du BTV est bicistronique. Un cadre de lecture chevauchant celui codant la protéine NS3 a été décrit et coderait une petite protéine de 50 à 59 aa [88].

Ce second cadre de lecture a été retrouvé dans plus de 300 souches de BTV correspondant aux 27 premiers sérotypes du virus. Il est également maintenu chez d'autres orbivirus transmis par des tiques ou des moucheron comme les virus AHSV, GIV ou le virus Kemerovo (KEMV). En revanche, il n'a pas été retrouvé chez l'EHDV ni chez le virus de l'encéphalose équine (*Equine encephalosis virus*, EEV). Chez les sérotypes classiques de BTV (BTV-1 à -24), ce cadre de lecture appelé initialement *S10-ORF2* coderait pour deux isoformes différentes, une de 59 aa nommée NS5 et une isoforme de 50 aa nommée NS5a. Cette dernière isoforme serait dépourvue des neuf premiers acides aminés situés du côté amino-terminal [88]. Chez les sérotypes atypiques BTV-25 à -36, seule l'isoforme de 50 aa serait codée (**Figure 12**).

L'expression de ces protéines au cours de l'infection est encore putative, cependant il existerait une pression de sélection positive de cet ORF [88]. En effet, l'étude de la fréquence des mutations synonymes et non synonymes au niveau du *S10-ORF2* montre un taux élevé de changements non-synonymes des codons indiquant une évolution de ce gène. Cette sélection positive serait plus élevée dans les souches isolées chez l'espèce bovine par rapport aux espèces ovine et caprine [89]. Ces données suggèrent donc que la pression de sélection est spécifique à l'hôte infecté et que NS5 pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la FCO.

BTV8-NS5	MTPSLNHQGMLRVHQCHHLCQRLPLKYWTKRCQTQLVQRKHKRRRRRLHSHRTRKRFVMM	59
BTV8-NS5a	-----	50
BTV25-NS5	-----..P..LHRRR..A...RS.I...I.....K.....T...Q.....	50
BTV26-NS5	-----..L.R.RRRR.RL..S.F.....L...K.....	50
BTV27-NS5	-----..P..PHRRR..M...RS.I.....RK.....T...Q.....	50
BTV36-NS5	-----..P..LHRRR..A...RS.I...I.....K.....T...Q.....	50

Figure 12 : Comparaison des séquences en acides aminés des NS5 et NS5a du BTV-8 avec quelques NS5 de BTV atypiques.

L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du programme informatique Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

6.4.2 Caractéristiques de la protéine

L'analyse de la séquence protéique de NS5 et NS5a a montré la conservation des quatre derniers aa (FVMM) au sein de toutes les séquences codantes, ainsi que de deux résidus cystéine en position 20 et 32. NS5 posséderait un domaine intracellulaire en N-terminal, suivi d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire en C-terminal. Une séquence de signal d'adressage au nucléole (*Nucleolar Localization Signal*, NoLS) est également prédite en position 41 à 45 (**Figure 13**) [89].

Malgré le manque de preuve de son expression au cours de l'infection, la description de NS5 a pu être faite de manière expérimentale. Son expression en cellules ovines CPT-Tert a été réalisée par transfection d'un plasmide contenant sa séquence codante. Ainsi, l'expression de NS5 fusionnée à une étiquette GFP (*Green Fluorescent Protein*) mais également à une étiquette HA (Hémagglutinine) a permis de mettre en évidence sa localisation nucléaire et nucléolaire par microscopie à fluorescence [88].

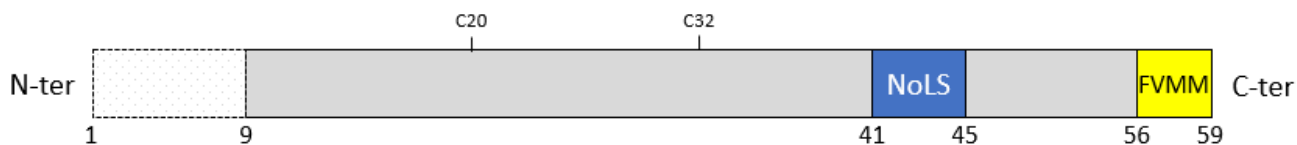


Figure 13 : Représentation schématique de la protéine NS5 du BTV.

NS5 possède 59 résidus ou 50 résidus sous sa forme la plus courte tronquée des 9 premiers aa (pointillés). La séquence des 4 derniers résidus est conservée entre tous les sérotypes du BTV (FVMM, jaune) ainsi que les deux cystéines en position 20 et 32. Un signal de localisation au nucléole est prédit entre les résidus 41 et 45 (NoLS, bleu). Les chiffres correspondent à la position des aa.

6.4.3 NS5 inhibe la transcription cellulaire

La localisation de NS5 et de NS4 étant identique, ceci suggère que leur fonction pourrait être synergique au niveau du compartiment nucléaire et nucléolaire.

Aussi, la capacité de NS5 à inhiber la transcription cellulaire a été étudiée à l'aide d'un système de gène rapporteur luciférase. Des cellules ovines CPT-Tert ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour NS5 et un plasmide codant pour la *firefly luciferase* sous contrôle d'un promoteur CMV, SV40 ou IFN- β . Les résultats montrent que l'expression de la *firefly luciferase* est largement inhibée en présence de NS5 et ceci de manière comparative entre les différents promoteurs. Cette fonction a été corrélée à la localisation nucléolaire de NS5. En effet, NS5 déléetée de son domaine NoLS n'était plus capable d'inhiber la transcription du gène rapporteur de la *firefly luciferase* sous contrôle du promoteur CMV [88].

D'autre part, la co-transfection de cellules CPT-Tert avec un plasmide codant pour la NS5 et l'ARN codant la *Renilla luciferase* a permis de mettre en évidence que NS5 n'inhibait pas la traduction de la protéine [88]. Tout comme NS4, NS5 semble donc capable d'inhiber de manière globale la transcription cellulaire sans toutefois bloquer la traduction.

6.4.4 NS5 n'est pas un antagoniste de la voie des interférons

La protéine NS4 ayant été décrite comme un antagoniste de la voie d'activation des interférons, un essai de protection à l'interféron a été réalisée pour vérifier si NS5 pouvait jouer le même rôle.

Pour cela, des cellules primaires ovines ovEC ont été infectées avec soit un BTV-8 sauvage soit un BTV-8 délété du *S10-ORF2*. Le même protocole que celui décrit en section 6.3.5 a été suivi afin de déterminer le taux d'IFN produit par les cellules infectées par le virus sauvage ou par le virus n'exprimant pas la NS5. Ce taux s'est révélé équivalent entre les deux conditions et sous-tend que NS5 ne modulerait pas la réponse immunitaire innée [88].

6.4.5 NS5 ne module pas la pathogenèse virale

L'impact de NS5 du BTV sur l'effet cytopathique et la cinétique de réplication a été étudié dans différentes lignées cellulaires. Ainsi des cellules ovines CPT-Tert, ovEC, ovFib (*ovine primary fibroblast*), des cellules humaines A549 et des cellules de culicoïde KC ont été infectées avec le BTV-8 sauvage ou le BTV-8 délété de *S10-ORF2*. Dans tous les modèles cellulaires utilisés, aucune différence d'effet cytopathique ni de taux de réplication n'a été observée entre les deux virus. Ces résultats ont été confortés par une étude *in vivo* où une mortalité similaire a été observée chez des souris infectées par les deux virus, et ceci dans deux modèles murins distincts (NIH-Swiss et IFNAR^{-/-}). NS5 ne fournirait donc pas d'avantage au BTV pour sa réplication ni modifier sa pathogenèse.

NS5 semble porter moins de fonctions que NS3 et NS4 et la preuve de son expression au cours de l'infection n'a pour le moment pas été faite. Cependant, son rôle pourrait être plus important que celui décrit jusqu'à maintenant.

Contexte du projet

1. Différences entre sérotypes classiques et atypiques

Comme décrit précédemment, des différences de pathogénicité mais également de mode de transmission existent entre certaines souches et sérotypes de BTV. Ces différences sont observées notamment avec le sérotype classique BTV-8 et l'un des sérotypes atypiques comme le BTV-27. Ces deux virus se distinguent l'un de l'autre par :

- Leur virulence et leur spectre d'hôte :
 - Le BTV-8 circulant de 2006 à 2008 a engendré une morbidité et une mortalité importantes au sein des troupeaux. Son spectre d'hôte est large puisqu'il peut infecter de nombreux ruminants domestiques et sauvages. En plus d'engendrer des signes cliniques chez les ovins, il se distingue particulièrement par sa capacité à déclencher des signes cliniques chez les bovins, espèce habituellement peu sensible au virus.
 - Le BTV-27 quant à lui, n'a été isolé que chez des chèvres asymptomatiques.
- Leur mode de transmission :
 - La première épizootie de BTV-8 a démarré dans le nord de l'Europe, puis s'est répandue sur une large zone géographique grâce à sa capacité à se transmettre via les vecteurs culicoïdes autochtones. De plus, le BTV-8 peut se transmettre verticalement par la voie transplacentaire, cette voie de contamination étant rarement constatée avec les autres souches de BTV.
 - Le BTV-27 lui, peut se transmettre de manière horizontale, par contact direct entre un animal infecté et un animal sain. Ce mode de transmission semble assez exceptionnel pour le BTV normalement décrit comme un virus non contagieux.

Les mécanismes moléculaires expliquant la virulence et le mode de transmission des souches de BTV ne sont que partiellement compris. Ils impliquent des facteurs viraux mais également des facteurs cellulaires de l'hôte. Aussi, la comparaison de souches possédant des caractéristiques différentes de virulence et de transmission nous paraît intéressante pour étudier ces mécanismes. Elle permettrait d'identifier des déterminants viraux et cellulaires impliqués dans la virulence du BTV, pouvant expliquer les différences phénotypiques observées entre ces sérotypes.

2. Intérêt d'étudier les interactions protéines virales/protéines cellulaires

Au cours de l'infection, le virus doit s'adapter à la cellule qu'il infecte afin de survivre et de se répliquer. Pour cela, il élabore des stratégies de détournement de la machinerie cellulaire dont les mécanismes sont régis par les interactions établies entre ses protéines et les protéines de l'hôte. Différents travaux étudiant les interactions entre protéines virales et protéines humaines ont permis de mettre en évidence des processus largement impliqués dans les infections virales comme la régulation du cycle cellulaire, le transport nucléaire ou la réponse immunitaire [90].

Aussi, l'établissement de l'interactome complet d'un virus est intéressant pour comprendre les mécanismes responsables de sa pathogénèse et de sa transmission. Deux techniques principales sont

utilisées pour rechercher à grande échelle et sans à priori les interactions entre protéines virales et protéines cellulaires : la co-purification d'affinité associée à la spectrométrie de masse et le double-hybride en levure. Ces deux approches sont complémentaires, la première permettant d'identifier des interactions au sein de complexes protéiques alors que la seconde permet d'identifier des interactions directes. De multiples interactomes complets ont ainsi été réalisés pour des virus d'intérêt en santé humaine, comme le virus de l'hépatite C (HCV) ou encore le virus de la dengue [91], mais pas pour des virus ayant un impact uniquement en santé vétérinaire. En ce qui concerne le virus de la FCO, de nombreuses fonctions portées par ses protéines ont déjà été décrites mais peu d'interactions ont été mises en évidence avec des partenaires cellulaires. Aussi, l'identification et la caractérisation d'interactions entre les protéines du BTV et les protéines cellulaires pourraient permettre de déterminer leurs rôles dans la pathogenèse et la transmission interspécifique.

3. Interactome comparé des BTV-8 et BTV-27 face à l'hôte bovin et au vecteur culicoïde

C'est dans ce contexte que des travaux de thèse menés par Cindy Kundlacz au sein de notre équipe de recherche ont visé à établir l'interactome complet du BTV. Celui-ci a été réalisé de manière comparative entre l'ensemble des protéines codées par deux sérotypes du BTV : le BTV-8 et le BTV-27, ainsi qu'entre les protéines cellulaires de l'hôte bovin et du vecteur culicoïde [92]. Pour ce faire, une méthode de criblage des interactions par double-hybride en levure (*yeast two-hybrid system*, Y2H) a été choisie. Son principe est basé sur la reconstitution d'un facteur de transcription par interaction protéique, donnant à la levure la capacité d'exprimer un gène rapporteur, servant de gène de sélection. Chaque protéine virale, appelée appât, a été testée en interaction avec un ensemble de protéines ou peptides, nommés proies, codé par une banque d'ADN complémentaires issue d'une culture de cellules bovines MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*) ou de cellules de culicoïdes KC. Après sélection des levures exprimant le gène rapporteur, les proies cellulaires pêchées avec les appâts viraux ont été identifiées par séquençage. Par cette approche, 276 protéines cellulaires ont été identifiées au moins deux fois pour interagir avec des protéines du BTV. Côté viral, 72,5 % des interactions impliquent les protéines non structurales du BTV, tandis que 80 % d'entre elles impliquent des protéines de l'hôte bovin. Ainsi, la majorité des interactions identifiées sont établies entre les protéines non structurales du BTV et les protéines cellulaires de l'hôte bovin. Les résultats de l'interactome du BTV ont permis l'identification de 92 protéines bovines interagissant avec les protéines NS du BTV-8 et 79 avec les protéines NS du BTV-27. Certaines d'entre elles peuvent être communes et d'autres spécifiques au sérotype (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Bilan du nombre d'interacteurs cellulaires identifiés à la suite des cribles Y2H des protéines du BTV-8 et du BTV-27.

VP : structurale, NS : non structurale, nb : nombre

		Protéines VP		Protéines NS		Total	
		BTV-8	BTV-27	BTV-8	BTV-27	nb	%
Cellules	KC	24	3	17	12	56	20
	MDBK	34	15	92	79	220	80
Total	nb	76		200			
	%	27.5		72.5			

4. Objectifs et stratégie employée

Représentant 171 interactions, soit 62% de la totalité des interactions identifiées à l'issue de cette recherche sans à priori, l'étude des interactions entre les protéines non structurales et les protéines bovines nous a paru évidente à prioriser (**Tableau 3**).

Parmi les protéines virales, NS4 et NS5 ont une description plus récente par rapport aux autres protéines et leurs fonctions ont été moins étudiées. A ce jour, les données scientifiques ont tout de même permis de mettre en évidence des caractéristiques communes, comme leur localisation au nucléole et leur capacité à inhiber la transcription cellulaire. Par l'étude des interactions qu'elles établissent avec les protéines de l'hôte bovin, nous souhaitons déterminer les mécanismes cellulaires expliquant leurs fonctions déjà connues et identifier d'autres rôles qu'elles pourraient jouer. En réalisant notre étude de manière comparative entre les protéines du BTV-8 et du BTV-27, nous souhaitons également identifier des facteurs cellulaires de restriction ou de dépendance impliqués dans l'infection par le virus de la FCO.

Afin de se concentrer sur les interacteurs majoritaires, les interacteurs bovins identifiés au moins trois fois lors du criblage par double-hybride en levure ont été sélectionnés. C'est ainsi que 14 protéines bovines ont été retenues pour cette étude :

- Neuf déterminées comme interacteurs de NS4 (**Tableau 4**) :

Tableau 4 : Protéines bovines sélectionnées pour l'étude de leur interaction avec NS4 du BTV-8 et BTV-27.

Le nombre de hits (nb hits) correspond au nombre de fois où la protéine bovine a été identifiée lors des cribles double-hybride en levure. Le code d'identité UniprotKB [93] a été déterminé après séquençage des proies et comparaison de leurs séquences avec une base de données.

Nom protéine	BTV-8 nb hits	BTV-27 nb hits	Total nb hits	Identité UniprotKB	Description
PAWR	17	22	39	F1MMF4	<i>PRKC apoptosis WT1 regulator protein</i>
WTAP	34	0	34	F1MN80	<i>Wilms tumor 1 associated protein</i>
KANSL2	18	8	26	Q2NL14	<i>KAT8 regulatory NSL complex subunit 2</i>
AATF	23	0	23	E1BDL9	<i>Apoptosis antagonizing transcription factor</i>
KIF12	18	0	18	E1BBY6	<i>Kinesin family member 1</i>
MAPK7	0	14	14	A5PKJ4	<i>Mitogen-activated protein kinase 7</i>
BRD2	7	0	7	Q32S26	<i>Bromodomain containing 2</i>
LUC7L	6	0	6	F1MMH3	<i>LUC7 like</i>
CCHCR1	5	0	5	F1N2Z6	<i>Coiled-coil alpha-helical rod protein1</i>

- Cinq déterminées comme interacteurs de NS5/NS5a (**Tableau 5**) :

Tableau 5 : Protéines bovines sélectionnées pour l'étude de leur interaction avec NS5/NS5a du BTV-8 et BTV-27.

Le nombre de hits (nb hits) correspond au nombre de fois où la protéine bovine a été identifiée lors des cribles double-hybride en levure. Pour le BTV-8 : nb hits avec NS5/ nb hits avec NS5a. Le code d'identité UniprotKB [93] a été déterminé après séquençage des proies et comparaison de leurs séquences avec une base de données.

Nom protéine	BTV-8 nb hits	BTV-27 nb hits	Total nb hits	Identité UniprotKB	Description
C1QBP	0/2	25	27	Q3T0B6	<i>Complement C1q binding protein</i>
MEGF6	1/0	13	14	E1BGE0	<i>Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6</i>
hnRNPK	5/8	0	13	Q3T0D0	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k</i>
MATN2	3/0	1	4	A5D7D5	<i>Matrilin 2 protein</i>
GRN	3/0	0	3	Q2HJI6	<i>Granulin</i>

La stratégie employée pour l'étude des interactions sélectionnées pour ce projet est basée sur 3 grands objectifs et est schématisée en **Figure 14** :

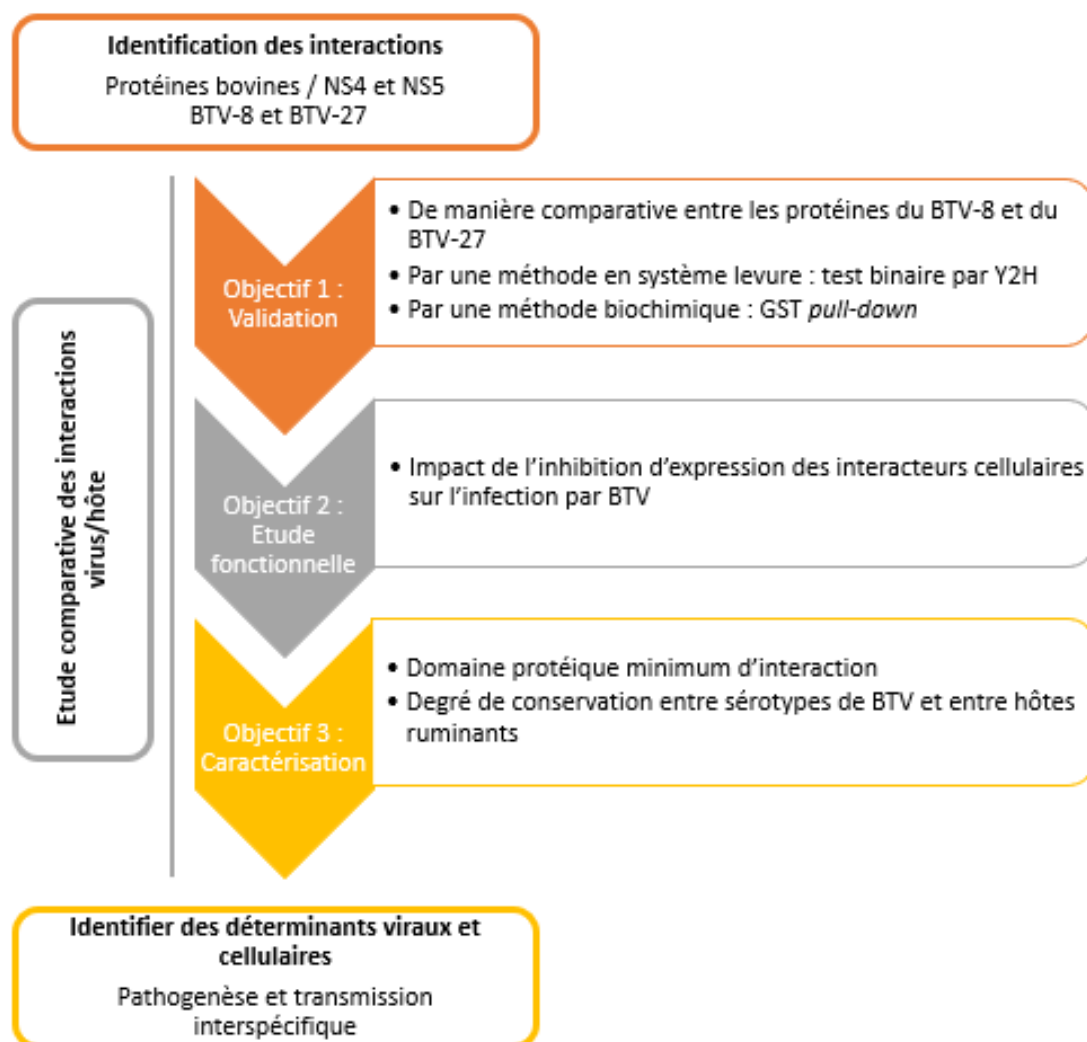


Figure 14 : Stratégie employée pour l'étude des interactions protéines virales/protéines cellulaires.

Matériels et méthodes

1. Cellules

Les cellules HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T*) et BSR (cellules dérivées des *Baby Hamster Kidney*, BHK-21) ont été cultivées en milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Thermofisher) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio) et 1% de pénicilline-streptomycine (Thermofisher). Les cellules BUcEC (*Bovine Umbilical Cord Endothelial Cells*) ont été cultivées en milieu *Minimal Essential Medium* (OptiMEM, Thermofisher) supplémenté avec 5% de SVF et 40 µg/ml de gentamicine (Thermofisher). Les cellules BUcEC sont des cellules endothéliales microvasculaires d'origine bovine qui ont été immortalisées. Cette lignée récemment établie par Lagrée *et al.* [94] est un modèle cellulaire sensible à l'infection par BTV et approprié pour étudier les mécanismes d'infection par ce virus se répliquant majoritairement dans les cellules endothéliales. Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

2. Virus

La souche du sérotype 8 du BTV utilisée pour le clonage des séquences codantes NS4 et NS5 et pour les essais d'infection a été isolée en France en 2006, amplifiée et titrée sur cellules BSR [95]. La souche BTV-27v02 isolée en Corse en 2014 a été utilisée pour le clonage des séquences codantes NS4 et NS5 du BTV-27 [38]. Pour le clonage des autres séquences codantes NS4, les souches suivantes ont été utilisées : BTV-4 (Corse, 2016) [96], BTV-25 (Allemagne, 2018) [35] et BTV-30 (Mongolie, 2016) [28].

3. Anticorps

Tous les anticorps utilisés dans les méthodes décrites plus bas sont listés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Anticorps utilisés au cours de ce projet et leurs applications.

(WB : *western blot*, IF : immunofluorescence, PLA : essai de ligature de proximité, HRP : *horseradish peroxidase*, GST : *glutathion-S-transferase*, Ac : anticorps)

Anticorps anti-	Espèce	Fournisseur	Référence	Dilution	Application
Flag couplé HRP	Souris	Sigma-Aldrich	A8592	1/10000	WB
GST	Lapin	Sigma-Aldrich	G7781	1/2500	WB
WTAP	Souris	Santa Cruz	sc374280	1/500	IF/PLA
METTL3	Lapin	Abcam	ab195352	1/1000	IF/PLA
NS4-BTV8	Lapin	UMR1161	/	1/250	PLA
VP5-AHSV	Souris	Ingenasa	m14ahsi10ae12	1/2000	WB
NS3-BTV1	Lapin	Dr F. Arnaud	/	1/1000	WB
Actine	Souris	Sigma-Aldrich	A3853	1/2000	WB
Ac de lapin couplé HRP	Chèvre	Thermofisher	10392324	1/5000	WB
Ac de souris couplé HRP	Chèvre	Thermofisher	10330974	1/5000	WB
Ac de lapin-AlexaFluor®488	Chèvre	Thermofisher	A11034	1/5000	IF
Ac de souris-AlexaFluor®555	Chèvre	Thermofisher	A21422	1/5000	IF

4. Amorces et siRNA

Toutes les amorces utilisées dans les méthodes décrites plus bas sont listées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Amorces utilisées pour les clonages et les RTqPCR.

Les amorces sont indiquées dans le sens 5' vers 3'.

Gène cible	Séquence spécifique sens	Séquence spécifique anti-sens
Amorces pour clonage Gateway®		
WTAP	atgaccaacgaagaacctctt	ttacaaaactgaacctgtac
AATF	atggcgggaccgcagtccttggc	ttaggcccttggtgtcatcacg
KANSL2	atgaacaggattcggattcacgtc	ttaactaacagaagtgggttccg
KIF12	atggaggaacgcgggtcgccc	ttagcgagggggtggctggct
PAWR	atgtgtggcggccatgtggaaca	ttacctgttagctgcccaaca
CCHCR1	atgtttcgaccttcaggttccac	ttagaggcagactgaagaggagg
hnRNPk	atggaaactgaacagccagag	ttagaatcctcaacatctgc
C1QBP	atgttccagctgctgcctgcgtgc	ttacttgccttgacaaaaccttg
GRN	atgtggactttggtgagctgggtgg	ttacagcagctgtctcgggtgcg
BTV8-NS4	atggtgagggggcgcag	ttagaactacctcttctccattc
BTV27-NS4	atggtgaggagacacaatcgac	ttacctctctactgtctgcg
BTV1-NS4	atggtgaggggacgcaatcgg	tacctctctctccattcgc
BTV4-NS4	atggtgagggggcgcagctcgg	tacctctctctccattcgc
BTV25-NS4	atggtgaagagacggaatcgc	tacctctctctccattcgc
BTV30-NS4	atggttaaggaggcacaatcgc	ttaacaccacctctctcc
BTV8-NS5	atgacacctctctcaaccacc	ttacatcatcacgaaacgcttccgcg
BTV8-NS5a	atgctccgagtgcaccgatgcc	ttacatcatcacgaaacgcttccgcg
BTV27-NS5	atgctcccagtgcaccgcac	ttacatcatcacgaaacgcttctg
Amorces pour mutagenèse dirigée		
WTAP_g331a	tgcacaactgagatcaacaatggtggaccagc	gctgggtccaccattgtgatctcagttgtgca
WTAP_g739c	gcagtctcaagcccaggcccagtagc	gtactcgggctggggttgagactgc
WTAP_a754g	caggcccaggtaccggcaggactacatct	agatgtagtctctccggtactcgggctg
WTAP_t913c	ccgaagatgacttctctctctccaggaatggg	cccattccctggagaaggaggaaagtcattctcgg
WTAP_c1099t	cccgaagaggagaaatctgtgagtgaggaaag	cttcccactcacagatttctctcttgcggg
WTAP_a1169g	gaatggcttgactcaagtgttaagtgtacagggttc	gaacctgtacattacacttgagccaagccattc
Amorces pour fragmentome WTAP		
WTAP-1	atgaccaacgaagaacct	/
WTAP-396	/	ttacaaaactgaacctgtac
WTAP-50	gatgtaactggcttaaggga	ttaattagagttgagatctgt
WTAP-100	cagcagcctagcgttgca	ttagacttgcctgaggtactg
WTAP-150	agccaaacaggcaaaaag	ttaatcaggcgtaaactcca
WTAP-200	agccaaacaggcaaaaagt	ttaactgcttttaagctctc
WTAP-250	accagcaggactacatct	ttaactcgggctgcggcttg
WTAP-300	gatgacttctctctctct	ttattcggctgtgtcccctc
WTAP-350	caccactcaaatgacaca	ttatgtgagagagtttctact
Amorces pour fragmentome NS4-BTV8		
NS4-1	atggtgagggggcgcagctc	/
NS4-22	atgtggatagacgcataca	/
NS4-44	cgaacgagaatgtcgacaga	/
NS4-66	ttggaactactggagcgaa	/
NS4-77	/	ttactacctctctctccattc
NS4-55	/	ttacgacagaggagatggaaagg

NS4-33	/	ttaatcccactgcagtatgtatg
NS4-11	/	ttatctggctgctctccgactgc
Amorces pour RTqPCR		
WTAP	ctactcagatccagttacactcaagcaa	cattttgggcttgttccagttt
CCHCR1	gctgcaccaagaacagctctc	gacctccgggttccagatt
AATF	gggaatggacgaccttggtg	ggccttgtcttctcactcg
PAWR	gcagaaagagcggaaacgag	tcttctcagaggcggtggt
BRD2	cctcctgaggtgtccaatcc	cagtttgacggcatccacag
KANSL2	gcagaagaagtggccctgat	tcatgttccactttgcgattg
LUC7L	tcgtcttgacagaccacttcg	tctctctctcgcctcctca
MAPK7	cattaaggaggccattgtgg	cagggtcagatc gatggtgt
hnRNPK	gcagttgccatcacccact	cgcagtcaaagtcgcttct
GRN	gttcccagaggctgtgtcat	ggggcagcagtgatcttgt
C1QBP	tcaacacagactccctggattg	gctgagctccaccaattcact
GAPDH	ggtcggagtgaacggattcg	actccaccacatactcagca
BTV8-Seg1	gttccgcgctaaaaacgaga	ccctggtggaatggtgaatc

Les séquences des siRNA (*small interfering RNA*) utilisés pour inhiber l'expression des gènes cellulaires d'intérêt dans les cellules bovines sont listées dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : siRNA utilisés pour inhiber l'expression des protéines cellulaires bovines.

ARNm ciblé	Séquences siRNA sens / anti-sens
WTAP	ccagcgaucaacuuguuautt / auaacaaguugaucgcuggtt
CCHCR1	ccuggagaagucucugaautt / auucagagacuucuccaggtt
AATF	ggaggagagugguauugaatt / uuccauaccacucuccctt
PAWR	gcgauuacacaacagaacatt / uguucuguuguguaaucgctt
BRD2	gguuaccaaccaguugcaatt / uugcaacugguugguaacctt
KANSL2	cccugauuaugcgugagaatt / uucucacgcauaaucagggtt
LUC7L	gcaaguuacacuugggauutt / aauccaaguguaacuugctt
MAPK7	gcauuaggaggccauugutt / acaauggccuccuuauugctt
hnRNPK	gcuguggaaugcuuaauutt / aauuuagcauuccacagctt
GRN	gcugugaagacaagauacatt / uguaucuugucuucacagctt
C1QBP	ggagcaccaggaguacauutt / aauguacuccuggugucctt
Contrôle	uucuccgaacgugucagutt / acgugacacguucggagaatt

5. Vecteurs plasmidiques

Les plasmides utilisés pour le clonage et l'expression des protéines d'intérêt sont listés dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Vecteurs plasmidiques utilisés pour le clonage et l'expression des protéines d'intérêt.

Nom	Etiquette de fusion	Résistance antibiotique	Application
pDONR207	/	Gentamicine	Clonage gateway®
pCI-Neo	3x-Flag	Ampicilline	GST pull-down
pDEST27	GST	Ampicilline	GST pull-down
pPC86	Gal4-AD	Ampicilline	Double-hybride en levure
pPC97	Gal4-BD	Ampicilline	Double-hybride en levure
peGFP-C1	GFP	Kanamycine	Microscopie à fluorescence

6. Constructions plasmidiques

6.1 Clonage par système Gateway® (Invitrogen)

6.1.1 Principe

Le système de clonage Gateway® permet de transférer des fragments d'ADN issus de produits de PCR, ou de plasmides, dans des plasmides en utilisant des séquences recombinantes. Une première réaction de recombinaison homologue appelée « réaction BP » permet d'insérer la séquence d'intérêt dans un vecteur donneur. L'enzyme BP clonase catalyse cette recombinaison et l'insertion des produits de PCR contenant les séquences attB dans les sites de recombinaison attP du vecteur donneur. Une fois que la cassette est intégrée au plasmide cible, il est nommé vecteur d'entrée et les séquences de recombinaison sont nommées attL (**Figure 15a**). Une deuxième réaction de recombinaison, appelée « réaction LR » permet de transférer les séquences d'intérêt du vecteur d'entrée vers un vecteur d'expression. L'enzyme LR clonase catalyse la recombinaison et l'insertion de la séquence d'intérêt contenant les séquences attL dans les sites de recombinaison attR du vecteur de destination. Une fois que la cassette est intégrée au plasmide cible, celui-ci est nommé vecteur d'expression et les séquences de recombinaison sont nommées attB (**Figure 15b**).

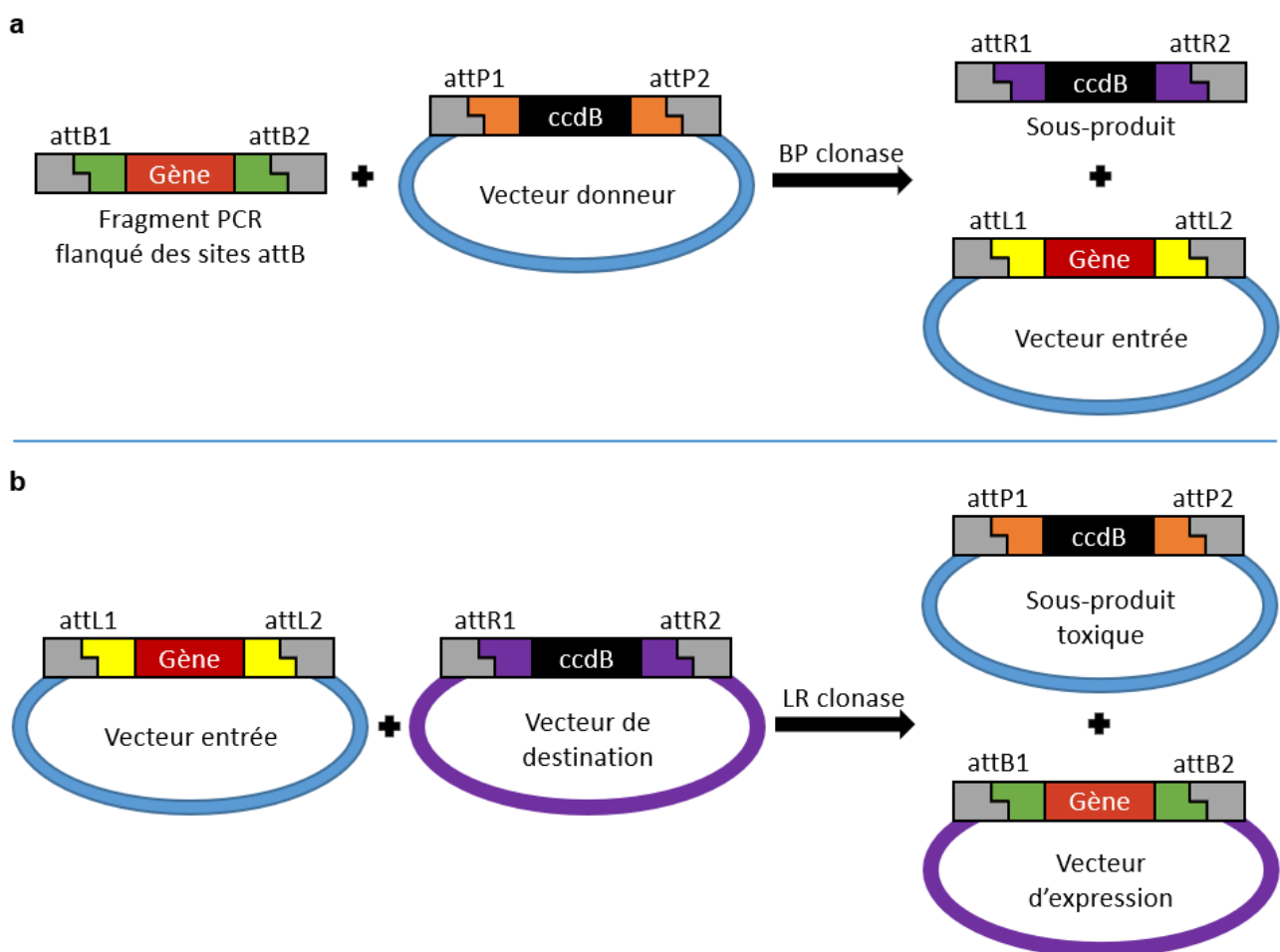


Figure 15 : Stratégie de clonage Gateway®.

(a) Réaction BP permettant le clonage du gène d'intérêt dans un plasmide appelé vecteur entrée par recombinaison homologue entre les sites attB et attP. (b) Réaction LR permettant l'insertion du gène d'intérêt du vecteur entrée dans un vecteur d'expression par recombinaison entre les sites attL et attR.

6.1.2 *Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)*

Les cadres ouverts de lecture (*open reading frame*, ORF) viraux (BTV-4, -8, -25, -27, -30) ont été amplifiés par RT-PCR à partir d'ARN extraits de cellules infectées. La transcription inverse a été réalisée avec le kit Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis (Roche) selon les recommandations du fabricant en utilisant 2 µL de matrice ARN (moins de 4 µg) et 2 µL d'amorces aléatoires (60 µM de random hexamer primer). L'ORF codant NS4 du BTV-1 a été cloné à partir d'un plasmide contenant le segment 9 fourni par Dr. Piet A. van Rijn [97]. Les ORFs bovins ont été amplifiés par PCR à partir de la banque d'ADN complémentaires d'origine bovine utilisée pour les cribles double-hybride en levure (section contexte 3).

Pour tous les ORFs bovins et viraux, des amorces spécifiques flanquées des séquences de recombinaison Gateway® (5'-ggggacaactttgtacaaaaaagttggc-3' / 5'-ggggacaactttgtacaagaaagttgg-3') ont été utilisées et sont listées dans le **Tableau 7**. Les PCR ont été réalisées avec un mélange réactionnel final de 50 µL contenant 1X de HotStarTaq MasterMix (Qiagen), 0,2 µM d'amorces sens et anti-sens et 50 ng de matrice ADN. Les ADN ont été dénaturés 15 minutes à 95°C puis 35 cycles d'amplification de la cible ont été réalisés avec une dénaturation de 30 secondes à 94°C, une hybridation de 30 secondes à 60°C et une élongation d'1 minute par kilobase à 72°C. Une élongation finale de 10 minutes à 72°C a été réalisée. Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose afin de vérifier l'amplification des séquences d'intérêt.

6.1.3 *Réactions BP*

Les produits d'amplification obtenus ont été intégrés au vecteur donneur pDONR par réaction BP. Pour cela 2 µL de produit de PCR ont été ajoutés à 250 ng du vecteur plasmidique pDONR207 et 2 µL d'enzyme BP clonase, le tout dans un volume réactionnel de 10 µL. La réaction a été incubée durant 1 nuit à 25°C.

6.1.4 *Transformation bactérienne et extraction d'ADN plasmidique*

Cinquante microlitres de bactéries thermocompétentes DH5α Library Efficiency (ThermoFisher) ont été transformées avec 3 µL de produit issu de la réaction de clonage BP. Après 30 minutes d'incubation sur glace, les bactéries ont subi un choc thermique de 45 secondes à 42°C puis ont été remises 2 minutes dans la glace. Les bactéries transformées ont été diluées au 1/10 dans un milieu liquide riche (SOC, ThermoFisher) avant une incubation sous agitation d'1 heure à 37°C. La suspension bactérienne a ensuite été étalée sur une gélose de milieu riche LB (Euromedex) contenant l'antibiotique correspondant à la résistance apportée par le vecteur plasmidique (**Tableau 9**) et incubée durant 1 nuit à 37°C.

Un clone par transformation a été sélectionné et a été mis en culture dans 4 ml de milieu LB liquide (Euromedex) durant 1 nuit. Le lendemain, la suspension bactérienne a été centrifugée durant 1 minute à 12 000 rpm et l'extraction d'ADN plasmidique a été réalisée à partir du culot bactérien avec le kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. L'ADN plasmidique purifié a été élué dans 50 µL d'eau ultrapure.

6.1.5 *Réaction LR*

Les constructions plasmidiques obtenues en pDONR ont ensuite servi de matrice pour transférer les ORFs d'intérêt dans différents vecteurs d'expression par réaction LR en mixant 250 ng

du vecteur « entrée » et 250 ng de vecteur de destination avec 2 μ L d'enzyme LR clonase dans un volume total de 10 μ L. La réaction a été incubée durant 1 heure à 25°C avant transformation de 30 μ L de bactéries DH5 α Library Efficiency avec 2 μ L de produit LR et extraction de l'ADN plasmidique comme décrit en [section 6.1.4](#).

6.2 Mutagenèse dirigée

L'ORF codant pour WTAP caprin a été obtenu à partir de la construction pDONR-WTAP-bovin par mutagenèse dirigée. Les mutagenèses dirigées ont été réalisées avec le kit QuikChange II Site-Directed mutagenesis (Agilent) en utilisant des amorces intégrant les mutations souhaitées (**Tableau 7**). Les amorces ont été conçues avec l'outil informatique QuikChange Primer Design (Agilent) et synthétisées par Eurofins. Les PCR ont été réalisées en mélangeant le tampon de réaction 1X avec 50 ng d'ADN matrice, 1 μ L de dNTP, 125 ng d'amorces sens et anti-sens et 1 μ L de polymérase *Pfu* Ultra. Après une dénaturation de 30 secondes à 95°C, 16 cycles d'amplification de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 55°C et 5 minutes à 68°C ont été réalisés. Le produit de PCR a ensuite été digéré durant 1 heure avec 1 μ L d'enzyme de restriction *Dpn* I, éliminant ainsi les brins parentaux non mutés. La transformation bactérienne a été réalisée avec 50 μ L de bactéries thermocompétentes XL1 Blue (Agilent) et 1 μ L de produit digéré, dans les mêmes conditions que décrites en [section 6.1.4](#).

6.3 Vérification par séquençage

Toutes les constructions plasmidiques obtenues ont été vérifiées par séquençage Sanger (Eurofins) à l'aide d'amorces spécifiques à chaque vecteur. Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel SerialCloner.

7. Test d'interaction des protéines en système de double-hybride en levure

L'ensemble des protocoles décrits dans cette partie ainsi que les méthodes de préparation des milieux de culture ont été largement inspirés de la publication de Vidalain et collaborateurs [98].

7.1 Principe

Le test binaire d'interaction en système levure est basé sur la reconstitution du facteur de transcription Gal4 lorsqu'une protéine fusionnée à son domaine de liaison à l'ADN (Gal4-BD) interagit avec la protéine partenaire fusionnée au domaine d'activation (Gal4-AD). La reconstitution du facteur de transcription entraîne la transactivation du gène rapporteur *HIS3* dont l'expression permet la croissance des levures sur un milieu dépourvu d'histidine (-H). Les tests d'interaction entre les protéines, dont les séquences ont été clonées au préalable dans les vecteurs d'expression en levure pPC86 et pPC97, ont été réalisés en transformant successivement les levures avec l'un et l'autre de ces plasmides. Le vecteur pPC97 code pour la protéine appât fusionnée au domaine Gal4-BD et permet la croissance de levures sur un milieu dépourvu de leucine (-L). Le plasmide pPC86 code pour la protéine proie fusionnée au domaine Gal4-AD et permet à la levure de croître sur un milieu dépourvu de tryptophane (-W) (**Figure 16**).

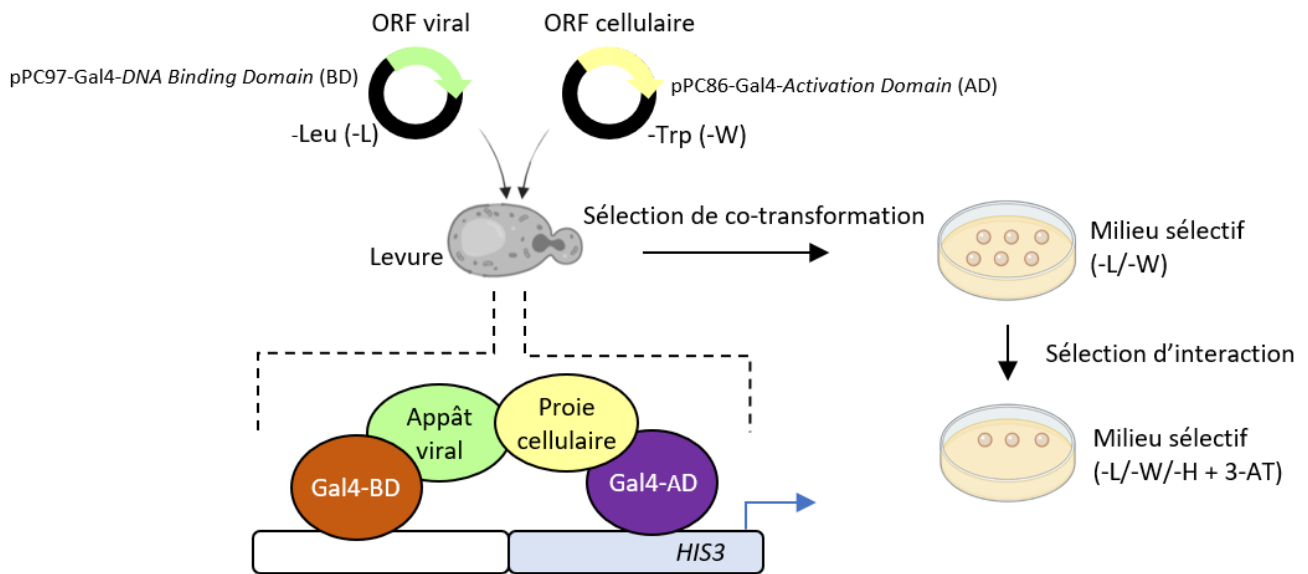


Figure 16 : Principe du double-hybride en levure.

La levure est co-transformée avec le plasmide pPC97 codant pour l'appât viral et le plasmide pPC86 codant pour la proie cellulaire. Les levures exprimant ces deux plasmides sont sélectionnées sur milieu sélectif dépourvu de leucine et de tryptophane (-L /-W). L'interaction entre la protéine virale et la protéine cellulaire permet la reconstitution du facteur de transcription Gal4 et ainsi la transactivation du gène rapporteur *HIS3* permettant à la levure de croître sur un milieu dépourvu d'histidine (-H).

7.2 Test classique

7.2.1 Transformation des levures

Classiquement, une transformation de levure est réalisée afin d'exprimer une protéine d'intérêt dont la séquence codante a été auparavant clonée (ici, par méthode Gateway®) dans l'un des vecteurs d'expression en levure, pPC86-Gal4-AD ou pPC97-Gal4-BD. Pour cela, la souche de levure *Y2H Gold* a été mise en culture liquide (milieu *Yeast Extract Peptone Dextrose*, BD) durant une nuit à 30°C. Le lendemain, la culture a été lavée à l'eau, puis avec une solution tampon TE/LiAc contenant 10 mM de Tris-HCl (ThermoFisher), 1mM d'EDTA (Sigma-Aldrich) et 100 mM d'acétate de lithium (Sigma-Aldrich). Les levures ont ensuite été reprises dans 20 µL de solution TE/LiAc, 2 µL d'ADN de sperme de saumon dénaturé (Sigma-Aldrich) et 250 ng du plasmide à incorporer avant que soit ajouté 120 µL contenant deux volumes de TE/LiAc et huit volumes de polyéthylène glycol (PEG, Sigma-Aldrich). Les levures ont alors été incubées 45 minutes à 30°C avant de subir un choc thermique de 15 minutes à 42°C permettant l'intégration du plasmide dans la levure. Enfin, les levures ont été lavées et resuspendues dans 20 µL d'eau puis la totalité a été déposée sur un milieu de culture solide et sélectif dépourvu de tryptophane (*TRP1* étant le gène de prototrophie porté par le plasmide pPC86) ou de leucine (*LEU2* étant le gène de prototrophie porté par le plasmide pPC97) et cultivée durant 3-4 jours à 30°C.

7.2.2 Evaluation des interactions

Les levures transformées successivement avec un plasmide pPC97-Gal4-BD et un plasmide pPC86-Gal4-AD ont été sélectionnées sur un milieu dépourvu de leucine et de tryptophane. Ces levures ont été resuspendues dans 300 µL d'eau puis 20 µL ont été déposés sur un milieu sélectif dépourvu de leucine et de tryptophane (-L/-W) et sur un milieu sélectif pour l'interaction dépourvu de

leucine, de tryptophane et d'histidine (-L/-W/-H) et supplémenté avec 5 mM de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT, Sigma-Aldrich), un inhibiteur compétitif de l'enzyme codée par le gène *HIS3* permettant de titrer l'expression basale du gène rapporteur.

7.2.3 Vérification des partenaires d'interaction par séquençage

Les levures transformées et s'étant développées sur le milieu sélectif -L/-W/-H + 5mM de 3-AT ont été lysées avec 125 µg de Zymolyase (Euromedex) durant 5 minutes à 37°C puis 5 minutes à 95°C. Une PCR ciblant l'ORF cellulaire fusionné au domaine Gal4-AD et une PCR ciblant l'ORF viral fusionné au domaine Gal4-BD ont été réalisées dans un mélange réactionnel de 50 µL contenant du tampon à 1X, 1 µL d'enzyme Terra (Takara), 0,3 µM d'amorce sens et anti-sens et 4 µL de levure lysée. Après une dénaturation de 2 minutes à 98°C, 35 cycles d'amplification ont été réalisés avec 10 secondes à 98°C suivis de 15 secondes à 62°C et 5 minutes à 68°C. Les produits d'amplification ont ensuite été purifiés et séquencés en utilisant des amorces spécifiques aux vecteurs pPC86 et pPC97 (séquençage Sanger, Eurofins). Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel SerialCloner.

7.3 Test avec clonage direct en levure par la méthode « gap-repair »

7.3.1 Principe

La méthode de clonage direct par recombinaison homologue en levure, appelée *gap-repair*, a été utilisée pour tester en interaction les partenaires cellulaires identifiés lors de la recherche sans a priori par double-hybride en levure, ainsi que pour rechercher des domaines protéiques minimum responsables d'interaction. Un produit d'amplification composé de séquences de recombinaison et de la séquence codant pour le partenaire identifié ou pour un domaine protéique est transformé en levure avec le vecteur d'expression (pPC86 ou 97) linéarisé et possédant les séquences de recombinaison complémentaires. Une fois transformée, la levure permet l'intégration et la re-circularisation du plasmide permettant alors l'expression de la séquence d'intérêt (**Figure 17**).

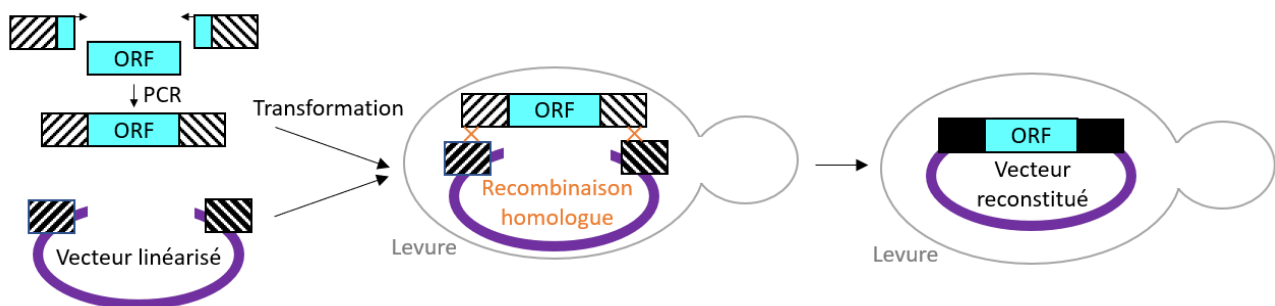


Figure 17 : Principe du clonage direct en levure par *gap-repair*.

La méthode de *gap-repair* permet de cloner directement en levure une séquence d'intérêt obtenue par PCR et à laquelle des séquences de recombinaison ont été flanquées dans son vecteur d'expression pPC97 ou pPC86 préalablement linéarisé et possédant les séquences de recombinaison complémentaires. La recombinaison homologue induisant la reconstitution du vecteur se fait directement au sein de la levure, laquelle peut alors exprimer la séquence d'intérêt.

7.3.2 Réamplification des produits de PCR issus du crible double-hybride

Les ADNc correspondants aux partenaires cellulaires identifiés lors des cribles par double-hybride en levure ont été réamplifiés par PCR. Le mix réactionnel comprenait 1 µL de produit de PCR ayant servi à l'identification initiale mélangé à 2 µL d'enzyme Terra (Takara), 50 µL de tampon, 0,3

μM d'amorce sens et anti-sens spécifiques du domaine Gal4-AD dans un volume final de 100 μL . Les produits ont été dénaturés 2 minutes à 95°C puis ont subi 15 cycles d'amplification avec une étape de dénaturation de 10 secondes à 98°C suivie d'une étape d'hybridation de 15 secondes à 62°C et une élongation de 5 minutes à 68°C.

En parallèle de cette ré-amplification, le vecteur plasmidique pPC86 a été linéarisé durant 1 heure à 25°C avec l'enzyme de restriction *SmaI* à raison d'une unité d'enzyme pour 1 μg de plasmide. La concentration du plasmide linéarisé a ensuite été ajustée à 10 ng/ μL .

7.3.3 Génération des séquences codant les fragments protéiques

Pour effectuer la cartographie des domaines protéiques d'interaction entre appât viral et proie cellulaire, des amorces sens et anti-sens ont été conçues afin de fragmenter les séquences d'intérêt (**Tableau 7**). Ces amorces ont été fusionnées à des séquences spécifiques permettant la recombinaison dans le vecteur pPC97-Gal4-BD (5'-gaagagagtagtaacaaagggtcaagacagttgactgtatcgtcgagg-3' / 5'-ccgcggtggcggccgttacttacttagagctcgacgttactta-3') ou dans le vecteur pPC86-Gal4-AD (5'-gatgaagatacccccaccaaaccacaaaaaagagggtgggtcgaatcaa-3' / 5'-ccgcggtggcggccgttacttacttacttagagctcgacgttactta-3') linéarisés par restriction avec l'enzyme *SmaI*. A partir de 50 ng de matrice ADN, chaque séquence codant pour un fragment a été obtenue par PCR selon le protocole utilisant la HotStarTaq (Qiagen) et décrit dans la [section 6.1.2](#).

7.3.4 Transformation des levures par gap-repair

Les levures ayant intégré un premier plasmide pPC97 ou pPC86 ont été mises en culture liquide durant une nuit, puis co-transformées en ajoutant 3 μL de produits d'amplification générés en [sections 7.3.2 & 7.3.3](#) et 10 ng de plasmide pPC86 ou 97 préalablement linéarisé. Les ORFs ont ainsi été directement clonés par recombinaison homologue (*gap-repair*) dans la levure et ont été exprimés en fusion avec la séquence Gal4-AD ou Gal4-BD. Les levures ont été mises en culture sur un milieu sélectif dépourvu de leucine et de tryptophane durant 3 à 4 jours à 30°C. La détermination et la vérification des interactions ont ensuite été réalisées comme décrit en [sections 7.2.2 & 7.2.3](#).

8. Test d'interaction des protéines par GST pull-down

8.1 Principe

La méthode de GST *pull-down* permet de tester une interaction entre deux protéines par co-précipitation d'affinité, l'un des partenaires protéiques étant exprimé en fusion avec une étiquette GST. A partir d'un lysat total de protéines, la construction GST et les partenaires associés sont co-purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose qui permettent la liaison par affinité de la GST avec son substrat glutathion. Les protéines virales NS4 ou NS5, couplées à l'étiquette GST, et les protéines cellulaires bovines, étiquetées 3x-Flag, ont été co-exprimées en cellules HEK293T afin de tester leur interaction.

8.2 Ensemencement et transfection des cellules

Des cellules HEK293T ont étéensemencées à $2 \cdot 10^6$ cellules par puits dans une plaque 6 puits. Le lendemain, les cellules ont été co-transfectées avec 500 ng de plasmide pDEST27-GST codant pour

la protéine virale et 500 ng de plasmide pCI-Neo-3xFlag codant pour la protéine cellulaire, mélangés à 4 μ L d'agent de transfection JetPrime et 300 μ L de tampon (JetPrime, PolyPlus).

8.3 Extraction des protéines

Trente-six heures après la transfection, les cellules ont été récupérées dans du phosphate-buffered saline (PBS, Thermofisher) puis culottées par 5 minutes de centrifugation à 1500 rpm. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont ensuite été lysées durant 30 minutes à 4°C avec l'ajout de 310 μ L de tampon de lyse à pH 7,4 contenant 120 mM de KCl (Sigma-Aldrich), 0,4% de NP40 (Euromedex), 2 mM de β -mercapto-éthanol (Sigma-Aldrich) et 1X d'anti-protéases (Complete, Roche). Les cellules lysées ont ensuite été centrifugées 20 minutes à 12 000 rpm, 280 μ L de lysat total ont été récupérés dont 260 μ L utilisés pour la purification d'affinité et 20 μ L pour contrôler l'expression des deux protéines d'intérêt après ajout de 20 μ L de bleu de charge (Life technologies).

8.4 Co-purification d'affinité

Les 260 μ L de lysat total ont été ajoutés à 35 μ L de billes de glutathion sépharose (Sigma-Aldrich) et 500 μ L de tampon de lyse puis incubés durant 2 heures sous agitation douce. Les billes ont ensuite été centrifugées 1 minute à 12 000 rpm et lavées à trois reprises durant 5 minutes avec 900 μ L de tampon de lyse. Après une dernière centrifugation d'1 minute à 12 000 rpm, le surnageant a été éliminé et les billes contenant les complexes protéiques associés aux protéines fusionnées à la GST ont été reprises dans 35 μ L de bleu de charge.

8.5 Analyse de l'expression protéique par *western blot*

Après 5 minutes de dénaturation à 95°C, 30 μ L de lysat total et 30 μ L de complexe protéique précipité ont été migrés sur gel de poly-acrylamide en condition dénaturante (*SDS-PAGE*, Life technologies) durant 1 heure à 160 volts. Les protéines ainsi séparées ont été transférées sur membrane de nitrocellulose (Life technologies) durant 1 heure à 30 volts. Les membranes ont ensuite été saturées durant 1 heure avec un tampon comprenant du PBS-1X (Euromedex), 0,1% Tween20 (Sigma-Aldrich) et 5% de protéines de lait (Regilait). Les membranes ont alors été incubées durant 1 nuit à 4°C avec l'anticorps anti-Flag conjugué à la *horseradish peroxidase* (HRP, Sigma-Aldrich) dilué au 1/10 000. Le lendemain, la présence des protéines fusionnées au 3x-Flag a été révélée par chimiluminescence avec le substrat Clarity-ECL (Bio-Rad) et visualisée sur l'imageur ChemiDoc (Bio-Rad). La détection des protéines fusionnées à la GST a été réalisée dans un second temps à partir des mêmes membranes. Les membranes ont été nettoyées durant 1 heure à l'aide d'un tampon comprenant 1X de PBS et 10 mM d'azide de sodium (Sigma-Aldrich) puis incubées 2 heures à température ambiante avec l'anticorps anti-GST (Sigma-Aldrich) dilué au 1/2500, lavées à trois reprises et incubées 45 minutes avec l'anticorps secondaire conjugué HRP et dilué au 1/5000 (Thermofisher). La révélation a été réalisée de la même manière que pour les protéines fusionnées 3x-Flag.

9. Etude du rôle des interacteurs cellulaires sur l'infection par BTV

9.1 Stratégie expérimentale

Afin d'étudier l'importance de l'interaction entre les protéines virales NS4 ou NS5 et les protéines bovines au cours de l'infection, l'expression de ces dernières a été inhibée par la transfection de petits ARN double brin interférents (*small interfering RNA*, siRNA). Des siRNA ont été conçus spécifiquement pour être complémentaires de chaque ARN messager codant pour l'un des partenaires cellulaires de NS4 et de NS5. La transfection de siRNA permet la reconnaissance du transcrite cible par le complexe *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) qui induit sa coupure et sa dégradation subséquente empêchant son expression dans la cellule. Une fois l'expression du partenaire cellulaire inhibée, les cellules sont infectées par le BTV-8 puis la réplication et la production virale sont évaluées par RTqPCR, *western blot* et titrage viral (**Figure 18**).

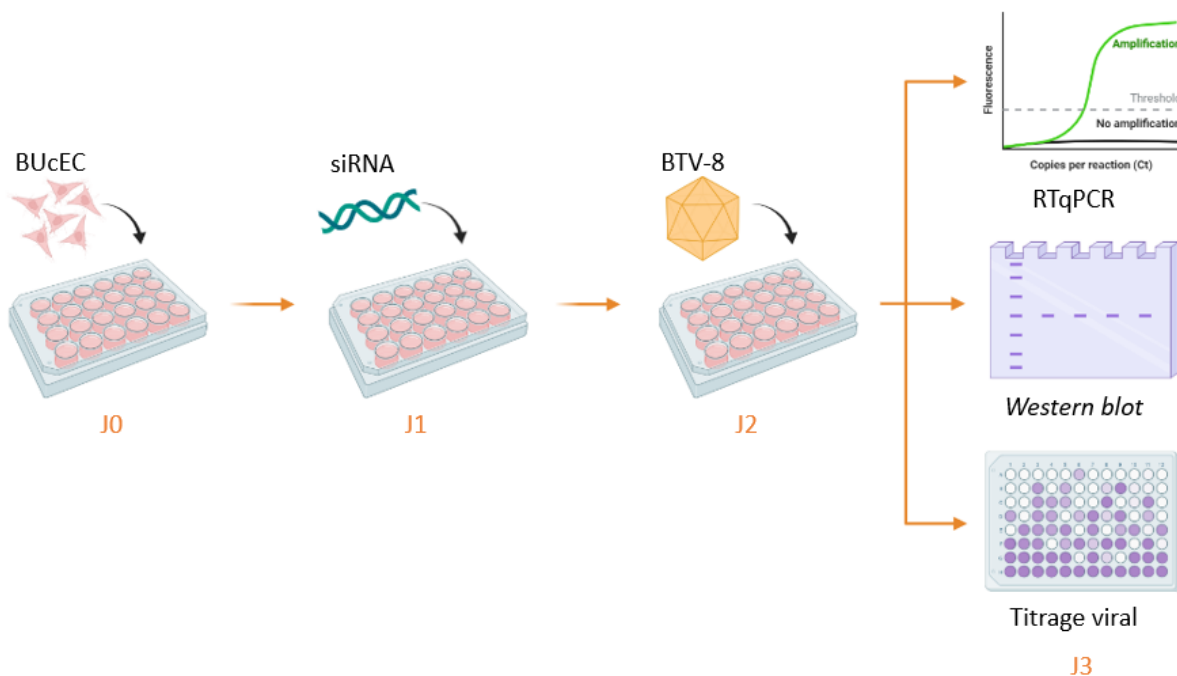


Figure 18 : Stratégie expérimentale pour étudier l'impact de l'inhibition des partenaires cellulaires de NS4 et NS5 sur l'infection par le BTV-8.

9.2 Design des siRNA et des amorces spécifiques à chaque interacteur cellulaire

Le design et la synthèse des siRNA ont été réalisés par la société Genecust. La séquence des siRNA (**Tableau 8**) possède une longueur comprise entre 21 et 24 paires de bases et est complémentaire d'une région de la séquence du transcrite ciblé. Un siRNA contrôle ne ciblant aucun gène spécifique a également été conçu.

L'inhibition de l'expression des ARN messagers de chaque gène cible a été vérifiée par RTqPCR par quantification relative et déterminée, arbitrairement, efficace si elle était supérieure à 60%. Pour cela, des amorces spécifiques ont été conçues à l'aide de l'outil informatique Primer3Plus et synthétisées par la société Eurofins (**Tableau 7**). Ces amorces encadrant la région ciblée par le siRNA ont une longueur comprise entre 18 et 22 nucléotides et une température d'hybridation de 62,5

°C ± 1°C. Leur composition en bases GC est comprise entre 40 et 60% et la longueur de l'amplicon est comprise entre 70 et 150 paires de bases.

9.3 Transfection des cellules par siRNA

Des cellules bovines BUcEC ont étéensemencées à $3 \cdot 10^4$ cellules par puits dans une plaque 48 puits. Vingt-quatre heures après leur ensemencement, les cellules ont été transfectées en mélangeant 1 µL d'agent de transfection et 20 µL de tampon (JetPrime, PolyPlus) avec 25 nM de siRNA contrôle (siCTR) ou 25 nM de siRNA cible.

9.4 Infection des cellules par BTV-8

Après 24 heures d'inhibition de l'expression des gènes cellulaires ciblés, les cellules ont été infectées avec le BTV-8 à une MOI (*multiplicity of infection*) de 0,02 ($1 \cdot 10^5$ cellules considérées). Pour cela, le milieu de culture des cellules a été retiré puis les cellules ont été rincées avec du milieu optiMEM dépourvu de sérum. Le milieu de rinçage a été retiré puis 100 µL d'inoculum comprenant 1400 TCID₅₀ (*median tissue culture infectious dose*) de BTV-8, correspondant à 2000 PFU (*Plaque forming units*), ont été ajoutés dans chaque puits. L'adsorption du virus par les cellules a été réalisée avec une incubation d'une heure à température ambiante. L'inoculum a ensuite été retiré et les cellules rincées avec du milieu sans sérum. Par puits, 300 µL de milieu optiMEM complet ont été ajoutés et les cellules ont été remises en culture à 37°C avec 5% de CO₂. Des cellules non infectées dites contrôles ont été traitées de la même manière mais avec l'ajout de 100 µL de milieu sans sérum à la place de 100 µL d'inoculum.

9.5 Extraction d'ARN et RTqPCR

Vingt-quatre heures post-infection, les ARN totaux ont été extraits avec le kit RNeasy Plus (Qiagen). Les cellules ont été récupérées dans 350 µL de tampon RLT contenant 1% de β-mercaptoéthanol puis l'extraction a été réalisée selon les recommandations du fabricant. Les ARN ont été élués dans 30 µL d'eau ultrapure. A partir des ARN extraits, l'efficacité des siRNA et la réplication virale ont été évaluées par RTqPCR (kit QuantiFast RT-PCR Sybrgreen, Qiagen). La quantité d'ARN cellulaire et viral a été calculée de manière relative par rapport à la quantité d'ARN du gène de ménage *GAPDH*. Le mélange réactionnel de 20 µL comprend 1X de QuantiFast SYBR Green Master mix, 10 µM d'amorce sens et 10 µM d'amorce anti-sens, 0,2 µL de QuantiFast RT Mix, 1,5 µL de matrice ARN et de l'H₂O qsp 20 µL. La quantification des ARN messagers correspondant aux cibles des siRNA a été réalisée en utilisant les amorces listées dans le **Tableau 7**. La quantification de l'ARN viral a été réalisée en ciblant une région du segment 1 du BTV-8. Le cycle de la RTqPCR comprend une étape de transcription inverse avec 10 minutes à 50°C suivie de 5 minutes à 95°C, une étape d'amplification avec 40 cycles de 10 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C suivie de l'établissement d'une courbe de fusion avec un segment de dénaturation de 10 secondes à 95°C, un segment d'hybridation d'1 minute à 65°C et d'un segment de fusion de 1 seconde par 0,1°C jusqu'à 97°C. Les réactions ont été lancées sur le thermocycleur LightCycler® 96 (Roche) et les valeurs de Ct (*Cycle threshold*) ont été obtenues à l'aide du logiciel LightCycler®96 SW1.1.

9.6 Analyse de l'expression protéique par *western blot*

Vingt-quatre heures post-infection BTV-8, les protéines ont été extraites en lysant les cellules durant 30 minutes avec 150 μL de tampon de lyse à pH 7,4 contenant 120 mM de KCl, 0,4% de NP40, 2 mM de β -mercapto-éthanol et 1X d'anti-protéases. Les lysats ont ensuite été centrifugés 20 minutes à 4°C à 12 000 rpm afin de culotter les débris cellulaires, 130 μL du lysat ont alors été récupérés et supplémentés avec 70 μL de bleu de charge. Après 5 minutes de dénaturation à 95°C, 30 μL de lysat ont été migrés sur gel *SDS-PAGE* durant 1 heure à 160 volts. Les protéines ainsi séparées ont été transférées sur membrane de nitrocellulose durant 1 heure à 30 volts puis la membrane a été incubée 1 heure avec un tampon de saturation. La membrane a été incubée 1 nuit à 4°C avec l'anticorps anti-actine au 1/2000 (Sigma-Aldrich), l'anticorps anti-VP5 d'AHSV/BTV au 1/2000 (Ingenasa) et l'anticorps anti-NS3 de BTV au 1/1000 (Don de F. Arnaud). Les membranes ont été lavées à trois reprises avant d'être incubées 45 minutes avec les anticorps secondaires conjugués HRP et dilués au 1/5000 (ThermoFisher). Trois lavages ont été effectués puis la présence des protéines actine (42 kDaltons), VP5 (59 kD) et NS3 (25,5 kD) a été révélée avec le substrat Clarity-ECL et visualisée sur l'imageur ChemiDoc (Bio-Rad). L'intensité des bandes observées a été quantifiée à l'aide du logiciel imageJ. Le taux d'expression des protéines virales VP5 et NS3 a été normalisé par rapport à l'expression de l'actine et calculé de manière relative par rapport à celui obtenu pour les cellules transfectées avec le siCTR.

9.7 Titrage viral

Les surnageants des cellules BUCeC infectées ont été dilués de 10 en 10 dans du milieu DMEM sans sérum jusqu'à la dilution 10^{-8} . Chaque dilution a été distribuée par 100 μL dans 6 puits d'une plaque de 96 puits. Ensuite, 20 000 cellules BSR ont été distribuées par puits dans un volume de 100 μL de milieu DMEM contenant 2% de pyruvate de sodium (ThermoFisher), 2% de pénicilline/streptomycine (ThermoFisher) et 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio). Les plaques ont été incubées à 37°C sous 5% de CO_2 durant 4 à 6 jours jusqu'à observation d'un effet cytopathique. Le pourcentage de lyse cellulaire de chaque puits a été déterminé après fixation et coloration des cellules. Le milieu de culture a été retiré et 75 μL d'éthanol à 80% (Carlo Erba) ont été ajoutés par puits. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, l'éthanol a été éliminé et 75 μL de bleu de méthylène à 1% (Euromedex) ont été ajoutés par puits et incubés 30 minutes à température ambiante. Le bleu de méthylène a été retiré puis les cellules ont été rincées avec 200 μL d'eau. La coloration des puits a ensuite été observée et le nombre de puits infectés pour chacune des dilutions du surnageant comptabilisé. Les puits ont été considérés infectés s'ils ont présenté au moins 50% de leur tapis cellulaire lysé. Le titre viral de chaque surnageant a alors été calculé selon la formule de Reed-Muench [99] et exprimé en TCID₅₀/ml.

10. Détermination de la localisation subcellulaire de l'interaction NS4/WTAP

10.1 Principe

La localisation cellulaire d'interaction entre protéine cellulaire et protéine virale a été étudiée par une méthode de ligature de proximité (*Proximity Ligation Assay*, PLA) à l'aide du kit commercial Duolink® in situ orange mouse/rabbit (Sigma-Aldrich). Après un marquage primaire des deux

partenaires par des anticorps spécifiques produits chez des espèces différentes, le principe de cette approche réside sur la ligature de deux oligonucléotides complémentaires couplés chacun à un des anticorps secondaires anti-anticorps de lapin ou de souris. Les anticorps secondaires couplés à ces oligonucléotides sont appelés sondes PLA. La ligature des oligonucléotides n'est possible que si les sondes PLA sont situées à moins de 40 nm l'une de l'autre. C'est uniquement dans ce cas et après une étape d'amplification qu'un signal fluorescent est généré au point de localisation de l'interaction et est détectable par microscopie à fluorescence (**Figure 19**).

En parallèle de cette méthode, l'expression et la localisation cellulaire des protéines d'intérêt ont été contrôlées par immunofluorescence classique.

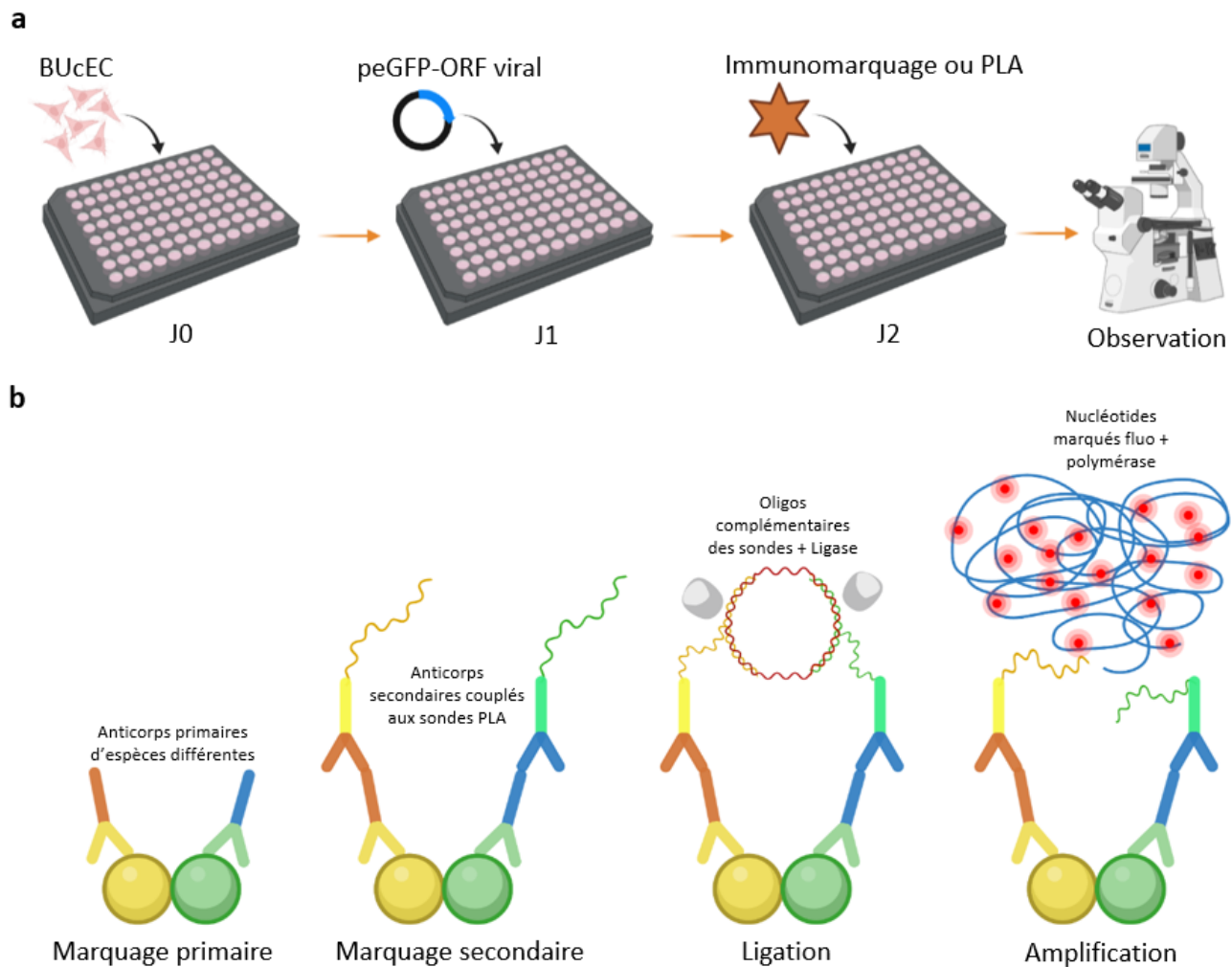


Figure 19 : Essai de la ligature de proximité (PLA).

(a) Des cellules BUCeC sont ensemencées à J0 puis transfectées à J1 avec le plasmide peGFP afin d'exprimer la protéine virale d'intérêt fusionnée à la GFP. Après 24 h d'expression, les cellules sont fixées avec 4% de PFA. Le marquage des protéines cellulaires d'intérêt est ensuite réalisé par immunofluorescence classique et le test de ligature de proximité avec la protéine virale est effectué en parallèle. **(b)** L'essai de ligature de proximité est composé de 4 étapes principales : 1-le marquage des deux protéines d'intérêt avec des anticorps spécifiques produits chez des espèces différentes (lapin et souris), 2-le marquage secondaire utilisant des anticorps anti-espèce couplés à des oligonucléotides appelés « sondes PLA ». 3-La ligature où la formation d'un ADN circulaire entre les sondes PLA est catalysée par une ligase. 4-L'amplification de l'ADN circulaire est catalysée par une polymérase permettant l'incorporation de nucléotides marqués d'un fluorophore. La ligature, et par conséquent l'émission d'un signal fluorescent, n'est possible que si ces sondes se situent à proximité (moins de 40 nm) l'une de l'autre.

10.2 Préparation des cellules

Des cellules BUcEC ont étéensemencées à $2 \cdot 10^4$ cellules par puits d'une plaque 96 puits (ibidi) adaptée pour la visualisation au microscope à fluorescence. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 500 ng du vecteur peGFP codant pour la NS4 du BTV-8 préalablement ajoutés à 50 μL de tampon et 1 μL d'agent de transfection (JetPrime, PolyPlus). Après 24 heures, les cellules ont été lavées à trois reprises avec un tampon PBS-1X (Thermofisher) puis incubées durant 20 minutes avec 100 μL de solution de fixation contenant 4% de paraformaldéhyde (Electron microscopy sciences, Euromedex). Après fixation, les cellules ont été rincées puis traitées 5 minutes avec 200 μL de tampon PBS 1X contenant 0,1 M de glycine (Sigma-Aldrich) afin d'inhiber l'auto-fluorescence des cellules. Les membranes cellulaires ont ensuite été perméabilisées par une incubation de 5 minutes avec 200 μL de tampon PBS-1X contenant 0,5% de Triton X100 (VWR) (**Figure 19a**).

10.3 Réaction de ligature de proximité

Les cellules ont été bloquées avec une goutte de la solution « *Duolink Blocking* » et une incubation de 30 minutes à 37°C en chambre humide. Le co-marquage primaire des deux protéines d'intérêt METTL3/WTAP et NS4/WTAP a été réalisée avec une incubation de 2 heures à température ambiante, en chambre humide, en présence de 60 μL des anticorps primaires d'espèce lapin anti-METTL3 ou anti-NS4 et d'espèce souris anti-WTAP dilués dans la solution « *Duolink Antibody diluent* » (**Tableau 6**). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois 5 minutes avec 200 μL de tampon de lavage « *Wash Buffer A à 1X* » puis incubées 1 heure à 37°C en chambre humide avec 60 μL des sondes PLA anti-anticorps de lapin et anti-anticorps de souris préalablement diluées au 1/5 dans la solution « *Duolink Antibody Diluent* ». Après deux lavages de 5 minutes avec la solution « *Wash Buffer A* », la ligature des sondes a été réalisée durant 30 minutes à 37°C en chambre humide avec 60 μL de ligase diluée au 1/40 dans la solution de ligature. Le signal a ensuite été amplifié par une incubation d'1 heure et 40 minutes à 37°C en chambre humide avec 60 μL de polymérase diluée au 1/80 dans la solution d'amplification. Les cellules ont ensuite été lavées 10 minutes avec la solution « *Wash Buffer B* » à 1X contenant le Hoechst au 1/10 000, 10 minutes avec la solution « *Wash Buffer B* » à 1X puis 1 minute avec la solution « *Wash Buffer B* » à 0,01X. Les cellules ont été conservées en présence de 200 μL de tampon PBS-1X (**Figure 19b**).

10.4 Marquage par immunofluorescence classique

Le co-marquage des protéines cellulaires endogènes WTAP et METTL3 a été réalisé à l'aide d'anticorps spécifiques. Un marquage de la protéine endogène WTAP a été réalisé dans les cellules transfectées avec peGFP-NS4-BTV8. Une étape de blocage a tout d'abord été effectuée en ajoutant 200 μL de tampon PBS-1X contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA, Euromedex) par puits. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, le tampon de blocage a été enlevé. Les anticorps primaires anti-METTL3 et anti-WTAP (**Tableau 6**) dilués respectivement au 1/1000 et 1/500 dans le tampon de blocage ont alors été ajoutés dans un volume de 60 μL par puits et incubés 2 heures à température ambiante. Après trois lavages de 5 minutes avec du tampon PBS-1X, les anticorps secondaires anti-anticorps de lapin, anti-anticorps de souris couplés respectivement à un fluorophore 488 et 555 (**Tableau 6**) dilués au 1/5000 et le Hoechst (Life Technologies) dilué au 1/10000 ont été

ajoutés dans un volume de 60 μL par puits et incubés 1 heure à température ambiante. Les cellules ont ensuite été rincées à deux reprises et conservées dans 200 μL de tampon PBS-1X.

10.5 Visualisation microscopique

Les cellules marquées par la méthode PLA ou par immunofluorescence classique ont été visualisées au microscope à épifluorescence Zeiss Axio Observer.Z1 avec les filtres FITC (longueur d'onde d'excitation (Ex) : 455-495 nm/longueur d'onde d'émission (Em) : 505-555 nm), AF546 (Ex : 533-558 nm / Em : 570-640 nm) et DAPI (Ex : 335-383 nm / Em : 420-470 nm). Les images ont été traitées à l'aide du logiciel Zeiss ZEN 2012.

11. Analyses bio-informatiques

11.1 Alignement de séquences

Les différentes séquences de NS4 du BTV ou de WTAP ont été comparées par alignement à l'aide du programme informatique Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

11.2 Analyses statistiques

Les tests statistiques de significativité ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9 avec un test de *Student* non apparié. Les résultats comparés ont été considérés non significativement différents (ns) si la valeur- $p > 0,05$, significativement différent * si $0,01 < \text{valeur-}p < 0,05$; ** si $0,001 < \text{valeur-}p < 0,01$; *** si $0,0001 < \text{valeur-}p < 0,001$ et **** si la valeur- $p < 0,0001$.

Résultats

La première partie de ce travail a porté sur la validation et la comparaison des interactions identifiées entre la protéine NS4 du BTV et les protéines cellulaires bovines (**Tableau 4**). Le rôle de chaque interacteur cellulaire dans l'infection par le BTV a ensuite été étudié par inhibition de son expression. Par la suite, les travaux ont visé plus spécifiquement à caractériser l'interaction entre la protéine NS4 du BTV-8 et la protéine bovine WTAP. Enfin, une seconde partie de ce projet a consisté à étudier les interactions identifiées avec la NS5 du BTV (**Tableau 5**). Les mêmes approches que pour NS4 ont été utilisées en vue de la validation des interactions de NS5 et pour comprendre leurs rôles dans l'infection virale.

1. Constructions plasmidiques

Afin de réaliser l'ensemble des expériences présentées dans ce chapitre consacré aux résultats, le clonage des séquences codantes pour les protéines d'intérêt a été effectué dans les vecteurs d'expression appropriés.

Les ORFs codant les protéines bovines et virales d'intérêt ont tout d'abord été amplifiés par PCR et clonés dans le vecteur donneur par clonage Gateway® et la réaction BP ([section M&M 6](#)). Ainsi, les ORFs bovins WTAP, AATF, KANSL2, KIF12, PAWR, CCHCR1, hnRNPK, C1QBP et GRN ont été obtenus dans le pDONR207 comme les ORFs viraux NS4, NS5, NS5a du BTV-8, NS4 et NS5 du BTV-27, NS4 des BTV-1, -4, -25 et -30. Cependant, les séquences codantes pour les protéines bovines BRD2, LUC7L, MAPK7, MEGF6 et MATN2 n'ont pu être obtenues par cette méthode de clonage. L'ORF codant pour WTAP caprin a été obtenu à partir de la construction pDONR207-WTAP-bovin après six mutagenèses dirigées ([section M&M 6.2](#)) pour muter les résidus A111, A247, S252, S305, P367 et N390. La séquence chimère BTV27-NS4²²⁻⁵⁵BTV8-NS4 a été insérée dans le plasmide pDONR207 par synthèse de gène (GeneCust).

Le sous-clonage dans les différents vecteurs d'expression a ensuite été réalisé grâce à la réaction LR du système Gateway® à partir des vecteurs « entrée ». Pour les tests d'interaction par la méthode de GST *pull-down*, les séquences codant WTAP, AATF, KANSL2, KIF12, PAWR, CCHCR1, hnRNPK, C1QBP et GRN ont été sous-clonées dans le vecteur pCI-Neo-3xFlag. Les ORFs viraux NS4, NS5, NS5a du BTV-8, NS4 et NS5 du BTV-27, ainsi que la séquence chimère BTV27-NS4²²⁻⁵⁵BTV8-NS4 et les NS4 des BTV-1, BTV-4, BTV-25 et BTV-30 ont été sous-clonées dans le vecteur pDEST27-GST. Afin de réaliser les tests d'interaction en système levure, l'ORF codant pour WTAP bovin a été cloné dans le vecteur pPC86-Gal4-AD et les séquences NS4, NS5, NS5a du BTV-8, NS4 et NS5 du BTV-27 et la séquence BTV27-NS4²²⁻⁵⁵BTV8-NS4 dans le vecteur pPC97-Gal4-BD. La séquence codant NS4 du BTV-8 a en plus été insérée dans le vecteur d'expression pGFP pour la visualisation de la protéine par microscopie à fluorescence.

2. Analyse comparative des interactions entre les protéines bovines et la protéine NS4 du BTV-8 et du BTV-27

La recherche sans a priori de partenaires cellulaires des protéines NS4 du BTV-8 et du BTV-27 par crible double-hybride en levure (Y2H) a permis l'identification de plusieurs interacteurs issus d'une banque d'ADNc d'origine bovine. Les proies cellulaires identifiées trois fois ou plus ont été

sélectionnées et leur interaction a été vérifiée de manière comparative avec les deux variants de NS4 par deux approches, le double-hybride en levure et le GST *pull-down*.

2.1 Par double-hybride en levure

La séquence minimale et la séquence la plus longue de chaque proie cellulaire sélectionnée ont été re-testées dans le système levure (**Tableau 4**). Les protéines bovines WTAP, AATF, KANSL2, KIF12, PAWR, BRD2, LUC7L, CCHCR1 et MAPK7 ont ainsi été testées en interaction avec la protéine NS4 du BTV-8 et celle du BTV-27 (**Figure 20**).

Pour cela, une souche de levure *Y2H Gold* a tout d'abord été transformée pour exprimer soit la NS4 du BTV-8 soit la NS4 du BTV-27 fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4-BD) ou transformée avec le plasmide pPC97-Gal4-BD vide pour contrôle. Les levures obtenues ont ensuite été co-transformées avec, d'une part les produits de PCR codant la forme la plus courte (FC) et la forme la plus longue (FL) de chaque interacteur bovin et, d'autre part avec le vecteur pPC86 linéarisé dans lequel se recombinent les amplicons en fusion avec le domaine d'activation de Gal4 (Gal4-AD). Les levures co-transformées ont été sélectionnées sur milieu de culture sélectif dépourvu de leucine et de tryptophane (-L/-W), les gènes de prototrophie étant apportés respectivement par le pPC97 et le pPC86. Ces levures ont alors été resuspendues et déposées, de nouveau sur milieu -L/-W (**Figure 20a**, panel haut), et d'autre part sur milieu avec la triple sélection -L/-W/-H + 5mM 3-AT pour tester l'interaction entre appât et proie via la transactivation du gène *HIS3* (**Figure 20a**, panel bas).

Toutes les levures ont été capables de croître sur le milieu dépourvu de leucine et de tryptophane prouvant que la co-transformation avec les constructions en pPC97 et en pPC86 a été efficace (**Figure 20a**, panel haut).

Les levures co-exprimant la NS4 du BTV-8 avec les formes courtes et longues des protéines bovines WTAP, AATF, KANSL2, KIF12, PAWR, BRD2, LUC7L et CCHCR1 ont été capables de croître sur milieu (-L/-W/-H), ainsi que les levures co-exprimant la NS4 du BTV-27 avec les formes courtes et longues des protéines bovines PAWR, KANSL2 et MAPK7 (**Figure 20a**, panel bas). Ces résultats confirment les données obtenues précédemment lors des cribles sans a priori (**Tableau 4**).

Afin d'évaluer la spécificité de ces interactions, les proies cellulaires ont également été testées en interaction avec la forme de NS4 qui n'a pas permis leur identification. Ainsi, et alors que ces interactions n'avaient pas été identifiées initialement, la protéine NS4 du BTV-27 est également capable d'interagir avec les protéines bovines LUC7L et CCHCR1. A l'inverse, aucune interaction entre la NS4 du BTV-27 et WTAP, AATF, KIF12, BRD2 n'a été mise en évidence. Quant à la NS4 du BTV-8, celle-ci ne semble pas capable d'interagir avec la protéine bovine MAPK7 (**Figure 20a**).

Cette étude comparative des interactions entre les NS4 du sérotype 8 et 27 du BTV dans le système double-hybride nous a permis d'identifier (**Figure 20b**) :

- des interacteurs cellulaires bovins communs pour les NS4 du BTV-8 et du BTV-27 : PAWR, KANSL2, LUC7L et CCHCR1
- des interacteurs cellulaires spécifiques à la NS4 du BTV-8 : WTAP, AATF, KIF12 et BRD2
- un interacteur spécifique à la NS4 du BTV-27 : MAPK7

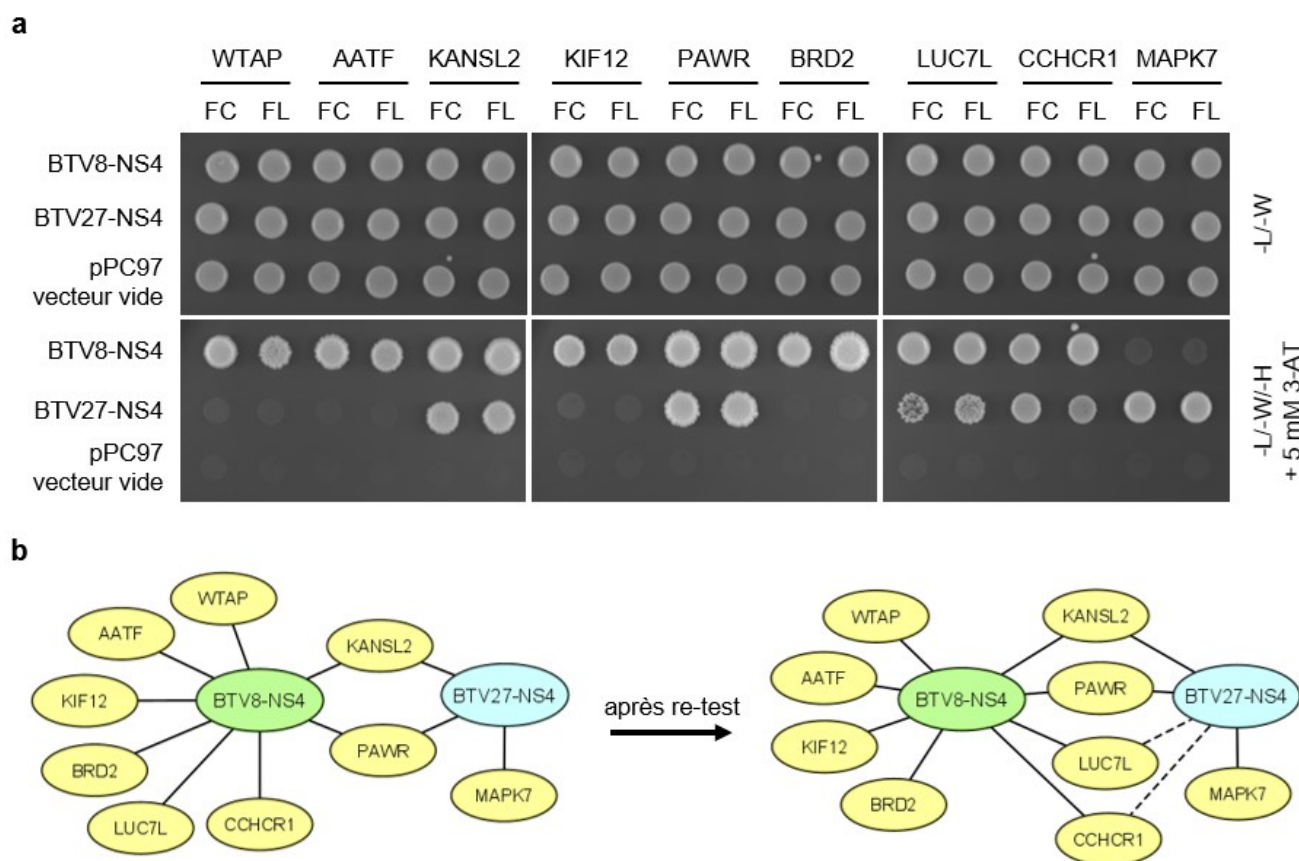


Figure 20 : Validation et comparaison des interactions entre les protéines cellulaires bovines et les NS4 du BTV-8 et du BTV-27 par le système de double-hybride en levure.

(a) Des levures exprimant NS4 de BTV-8 ou -27 fusionnées au domaine Gal4-BD ont été co-transformées avec des produits de PCR codant la forme la plus courte (FC) et la forme la plus longue (FL) de chaque proie cellulaire comme indiquée en présence du plasmide pPC86 pour permettre leur recombinaison et expression en fusion avec le domaine Gal4-AD directement dans la levure. Les levures ont été étalées respectivement sur milieux -L/-W comme contrôle de co-transformation et -L/-W/-H comprenant 5mM de 3-AT pour tester l'interaction entre appât et proie par transactivation du gène *HIS3*. (b) Les interactions de NS4 BTV-8/27 avec leurs proies cellulaires respectives ont été représentées sous forme de cartes à l'aide du logiciel Cytoscape (version 3.9.0). Les interactions obtenues lors des cribles apparaissent sous forme de traits pleins. Les traits pointillés représentent les interactions nouvellement identifiées lors du test illustré en (a).

2.2 Par GST pull-down

Afin de valider par une approche biochimique les interactions mises en évidence précédemment, celles-ci, à l'exception des protéines BRD2, LUC7L et MAPK7, ont été testées par une méthode de co-purification par affinité, le GST pull-down (Figure 21).

Pour cela, des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec les constructions exprimant la GST seule ou fusionnée avec BTV8-NS4 ou BTV27-NS4 et les constructions exprimant l'étiquette 3xFlag fusionnée à WTAP, AATF, KANSL2, KIF12, PAWR ou CCHCR1. Les cellules ont été lysées 36 heures après la transfection. Les lysats totaux et les complexes protéiques purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose ont été analysés après migration sur gel SDS-PAGE par western blot avec des anticorps anti-GST ou anti-Flag.

L'ensemble des constructions 3xFlag a été correctement détecté dans les lysats totaux (Figure 21, panel bas). Les protéines BTV8-NS4, BTV27-NS4 fusionnées à la GST et la GST seule ont bien

été purifiées par précipitation avec les billes de glutathion sépharose (**Figure 21**, panel milieu). Les protéines AATF, KIF12, PAWR et CCHCR1 ont été co-purifiées avec les protéines NS4 du BTV-8 et du BTV-27 de manière identique. La protéine WTAP a également été co-précipitée avec BTV8-NS4. En comparaison, sa détection avec la NS4 du BTV-27 est beaucoup plus faible suggérant une très faible interaction entre ces deux protéines. La protéine KANSL2 ne semble pas interagir spécifiquement avec NS4, les bandes observées révélant une liaison aspécifique avec l'étiquette GST ou avec les billes de glutathion sépharose (**Figure 21**, panel haut). La protéine PAWR a également été détectée en purifiant la GST seule, cependant la bande observée est nettement moins intense que celles visualisées avec les deux variants de NS4.

Les interactions entre la NS4 du BTV-8 et les protéines bovines WTAP, AATF, KIF12, PAWR et CCHCR1 sont confirmées par l'approche biochimique utilisée ici. Les protéines PAWR et CCHCR1 montrent aussi une interaction avec la NS4 du BTV-27, comme ce qui a été observé en système levure. Alors que l'interaction entre les protéines cellulaires KIF12 et AATF avec la NS4 du BTV-8 semblait spécifique en levure, ici ces partenaires cellulaires ont aussi été capables d'interagir avec BTV27-NS4. La spécificité d'interaction entre WTAP et NS4 du BTV-8 mise en évidence en système levure est confirmée par la méthode de GST *pull-down*. L'interaction entre NS4 et KANSL2 n'est, par contre, pas confirmée par cette approche.

Ainsi, les résultats obtenus par cette deuxième approche montrent :

- des interacteurs cellulaires bovins communs aux NS4 du BTV-8 et du BTV-27 : AATF, KIF12, PAWR et CCHCR1
- un interacteur spécifique à la NS4 du BTV-8 : WTAP

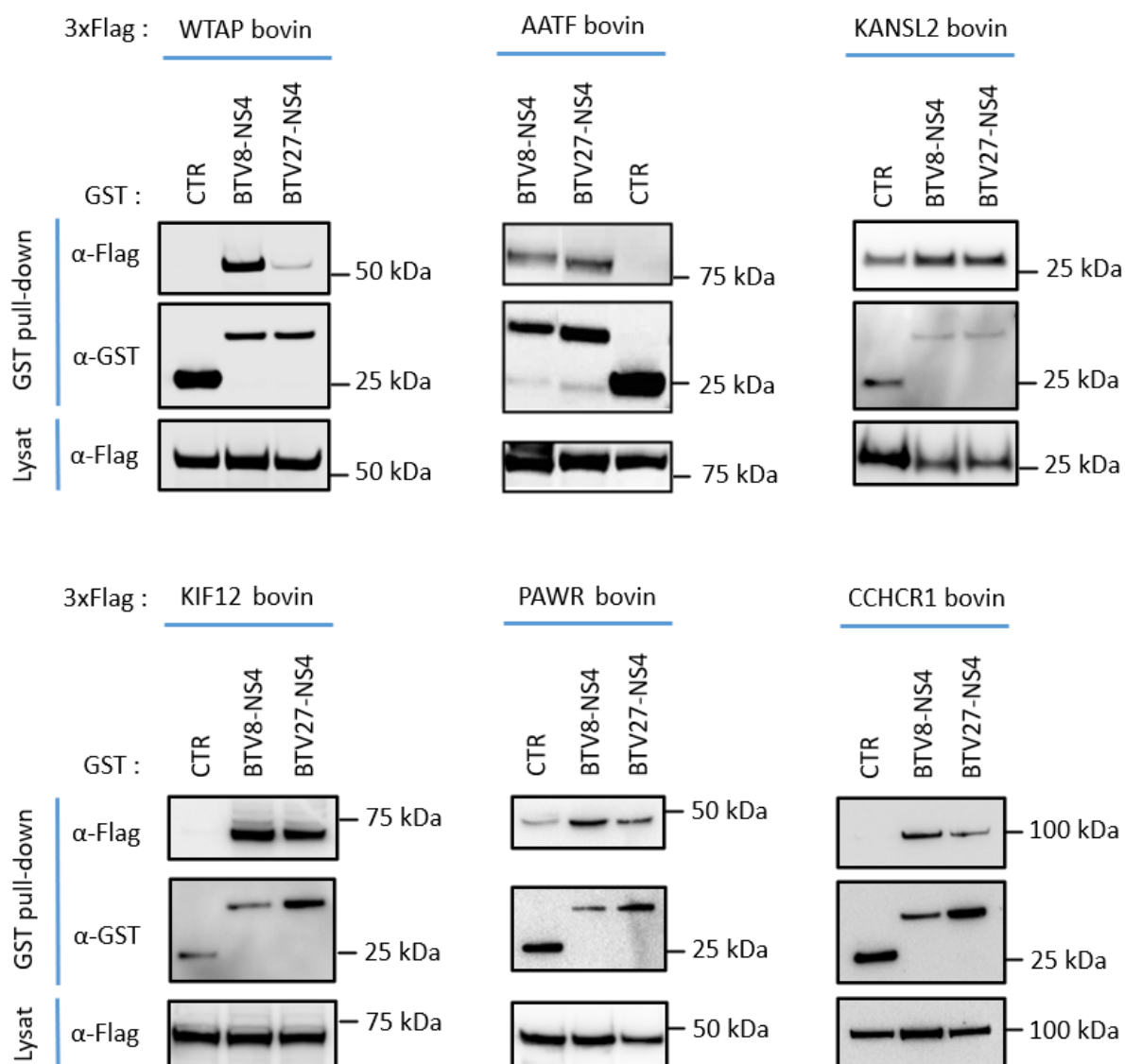


Figure 21 : Test et comparaison des interactions entre les protéines cellulaires bovines et les NS4 du BTV-8 et du BTV-27 par la méthode de GST pull-down.

Des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec 500 ng de vecteur exprimant la GST seule (contrôle négatif) ou fusionnée avec la protéine virale NS4 du BTV-8 ou du BTV-27 et 500 ng de vecteur exprimant l'une des protéines bovines sous sa forme entière et fusionnée à une étiquette 3xFlag. Les cellules ont été lysées 36 heures après transfection et les complexes protéiques purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. L'expression dans les lysats totaux des protéines fusionnées au 3xFlag (panel du bas), la co-purification des protéines fusionnées à la GST (panel du milieu) et des protéines fusionnées au 3xFlag (panel du haut) ont été analysées par *western blot*. Les protéines fusionnées à la GST et au 3xFlag ont été détectées respectivement à l'aide d'un anticorps anti-GST et anti-Flag. Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués en kiloDalton (kDa).

3. Etude du rôle des interacteurs cellulaires bovins de NS4 lors de l'infection par le BTV-8

Un screening de l'ensemble des interacteurs de NS4 a été réalisé afin de comprendre le rôle de chaque interaction établie entre la NS4 du BTV et les protéines cellulaires bovines identifiées. Pour cela, des cellules bovines BUcEC ont été transfectées avec des siRNA ciblant spécifiquement chacun des gènes codant pour les protéines d'intérêt afin de bloquer leur expression ou en contrôle avec un siRNA ne ciblant aucun de ces gènes (siCTR). Les cellules ont ensuite été infectées avec une souche de BTV-8 puis l'impact de l'inhibition de chaque interacteur cellulaire sur l'infection virale a été étudié.

L'inhibition de l'expression des interacteurs cellulaires et la réplication virale ont été évaluée par RTqPCR. Le taux d'expression de VP5 et de NS3 du BTV a été étudié par *western blot* et les surnageants ont été titrés pour évaluer la production virale. L'efficacité des siRNA à bloquer l'expression des gènes cibles avait été évaluée au préalable. Tous les siRNA désignés spécifiquement pour les gènes bovins ont été testés et seuls les siRNA ciblant le gène codant pour KIF12 n'ont pas été validés du fait d'une inhibition trop faible (section M&M 9.2). L'impact de l'inhibition d'expression de WTAP, AATF, CCHCR1, PAWR, BRD2, LUC7L, MAPK7 et KANSL2 a donc été étudié. Cependant, les résultats obtenus pour MAPK7 et KANSL2 ne sont pas montrés ici, seuls les résultats ayant été confirmés par deux expériences menées indépendamment sont présentés ci-dessous. Enfin, le titre viral n'a pour le moment été évalué que dans les expériences concernant WTAP et AATF.

3.1 Impact de l'inhibition de WTAP

Concernant la protéine WTAP, les cellules bovines BUcEC transfectées avec les siRNA ciblant WTAP (siWTAP) ont présenté une quantité d'ARN codant pour WTAP diminuée d'environ 70% par rapport aux cellules transfectées avec les siRNA contrôles (siCTR). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non infectées et infectées par le BTV-8, suggérant que l'infection ne module pas l'expression de la protéine cellulaire (**Figure 22a**, graphique gauche).

Dans les cellules infectées et transfectées avec les siWTAP, la quantité d'ARN correspondant au segment 1 du BTV est très légèrement diminuée par rapport aux cellules contrôles mais pas de manière significative (**Figure 22a**, graphique droit). Dans les cellules infectées où l'expression de WTAP est bloquée, le taux d'expression de VP5 et NS3 est environ deux fois plus faible que dans les cellules contrôles (**Figure 22b**). De plus, le titre viral des surnageants correspondants aux cellules transfectées avec le siWTAP est deux fois moins élevé que celui observé dans les surnageants des cellules transfectées avec le siCTR (**Figure 22c**). L'inhibition de l'expression de WTAP dans les cellules bovines diminue donc le taux d'expression des protéines virales ainsi que la production virale, suggérant un effet défavorable pour le BTV.

3.2 Impact de l'inhibition de AATF

La transfection des cellules bovines avec les siRNA ciblant AATF (siAATF) a permis de diminuer la quantité d'ARN codant pour AATF d'environ 85%. Par ailleurs, la transcription du gène *AATF* n'est pas modulée par l'infection au BTV-8 (**Figure 22d**, graphique gauche). Dans les cellules infectées et où AATF n'est plus exprimée, la quantité d'ARN viral est deux à trois fois plus élevée par

rapport aux cellules transfectées avec le siCTR (**Figure 22d**, graphique droit). Les protéines virales VP5 et NS3 sont aussi deux à trois fois plus exprimées dans les cellules où AATF est inhibée par rapport aux cellules contrôles (**Figure 22e**). Le titre viral quant à lui est environ deux fois plus fort lorsque l'expression d'AATF est bloquée (**Figure 22f**). A l'inverse de WTAP, lorsque l'expression d'AATF est inhibée, le BTV-8 voit sa réplication et sa production augmentée.

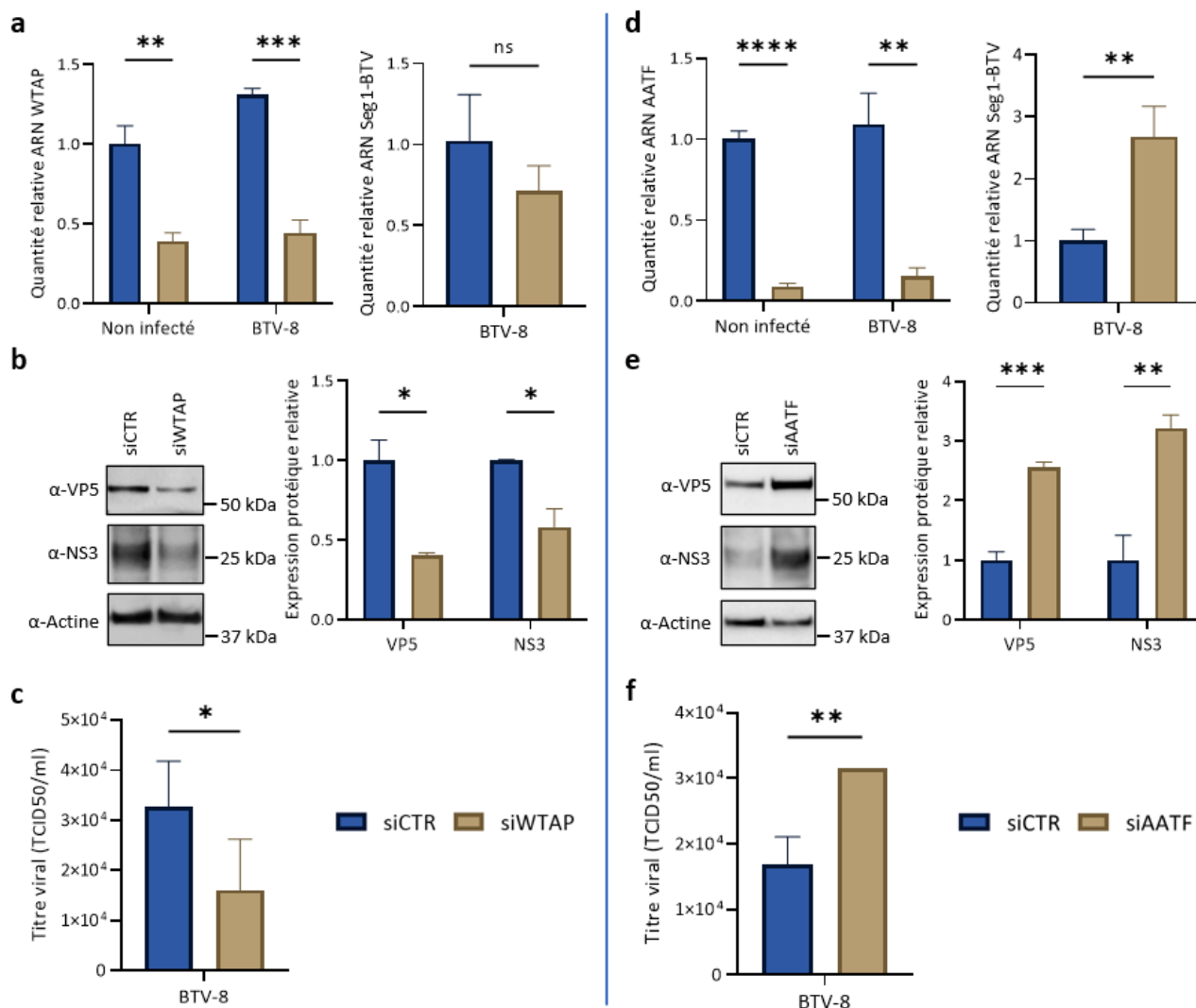


Figure 22 : Impact de l'inhibition d'expression des interacteurs bovins WTAP et AATF sur l'infection par BTV-8.

Des cellules BUcEC ont été transfectées avec 25nM de siRNA ciblant les gènes *WTAP* et *AATF* ou des siRNA non spécifiques comme contrôle (siCTR). Vingt-quatre heures après, les cellules ont été infectées par le BTV-8 à la MOI de 0,02. Après 24h d'infection, les surnageants des cellules ont été récoltés, les ARN totaux et les protéines totales ont été extraits. Les graphiques ont été obtenus à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 9.3.1) à partir des résultats d'une expérience comprenant des triplicats biologiques et étant représentative d'au moins deux expériences indépendantes. Un test statistique de *Student* non apparié a été appliqué : les résultats ont été considérés non significativement différents si $p > 0,05$ (ns), significativement différent si $p < 0,05$ avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$. Les barres d'erreur représentent les écarts types. L'effet de l'inhibition de WTAP (**a**, **b**, **c**) et de AATF (**d**, **e**, **f**) sur l'infection par BTV-8 a été évalué : (a et d) L'expression de l'ARNm codant pour WTAP ou AATF et celui correspondant au segment 1 du BTV a été évaluée par RTqPCR. La quantité relative a été calculée en fonction de la condition contrôle (siCTR) et normalisée avec le gène *GAPDH*. (b et e) L'expression des protéines VP5 et NS3 du BTV a été évaluée par *western blot*. L'intensité des bandes observées a été quantifiée à l'aide du logiciel imageJ. A partir de l'analyse d'image des triplicats biologiques, le taux d'expression a été calculé de manière relative par rapport à la condition contrôle (siCTR) et normalisée avec l'expression de l'actine. (c et f) Les surnageants ont été titrés sur cellules BSR par la méthode de dilution limite et le titre viral est exprimé en TCID50/ml.

3.3 Impact de l'inhibition de CCHCR1

Les cellules bovines ayant été transfectées avec les siRNA ciblant CCHCR1 (siCCHCR1) voient leur quantité d'ARN codant pour cette protéine diminuée d'environ 75%. D'autre part, l'infection des cellules par le BTV-8 n'a pas modulé la transcription de ce gène (**Figure 23a**, graphique gauche). L'inhibition de l'expression de CCHCR1 n'a pas d'effet sur la quantité d'ARN viral qui est identique entre les cellules transfectées avec les siCCHCR1 et les siCTR (**Figure 23a**, graphique droit). Dans les cellules transfectées avec les siCCHCR1, l'expression des protéines virales VP5 et NS3 est largement diminuée par rapport aux cellules contrôles avec, environ, cinq fois moins de VP5 et quatre fois moins de NS3 détectées (**Figure 23b**). Bien que l'inhibition de CCHCR1 ne semble pas moduler la réplication virale, la diminution de l'expression des protéines virales montre un impact défavorable à la production virale.

3.4 Impact de l'inhibition de PAWR, BRD2 et LUC7L

La quantité d'ARN codant pour PAWR a été diminuée d'environ 80% dans les cellules bovines transfectées avec les siPAWR. Cette quantité est similaire dans les cellules non infectées et infectées par le BTV-8 (**Figure 23c**, graphique gauche). L'inhibition de l'expression de PAWR dans les cellules infectées entraîne une augmentation de l'ARN viral, bien que cette augmentation ne soit pas significative par rapport aux cellules transfectées avec les siCTR (**Figure 23c**, graphique droit). Le taux d'expression des protéines virales est similaire entre les cellules transfectées avec les siCTR et les siPAWR (**Figure 23d**).

L'inhibition de l'expression de BRD2 dans les cellules bovines transfectées avec les siBRD2 est d'environ 65% et son expression n'a pas été modulée dans les cellules infectées (**Figure 23e**, graphique gauche). La quantité d'ARN viral est très légèrement augmentée dans les cellules n'exprimant plus BRD2, cependant cette tendance n'est pas significative par rapport aux cellules contrôles (**Figure 23e**, graphique droit). L'observation de l'expression des protéines virales VP5 et NS3 ne met pas en évidence d'effet significatif de l'inhibition de l'expression de BRD2 dans les cellules bovines (**Figure 23f**).

Dans les cellules transfectées avec les siLUC7L, la quantité d'ARN de ce gène est diminuée d'environ 75%. Aucune différence n'a été observée entre les cellules non infectées et les cellules infectées par le BTV-8 (**Figure 23g**, graphique gauche). L'inhibition de l'expression de LUC7L dans les cellules n'a pas modifié la quantité d'ARN viral détectée dans les cellules infectées (**Figure 23g**, graphique droit), ni le taux d'expression des protéines virales (**Figure 23h**).

L'inhibition de l'expression des protéines PAWR, BRD2 et LUC7L dans les cellules bovines n'a pas eu d'effet significatif sur la réplication virale ni sur l'expression des protéines du BTV. Aucun rôle potentiel de ces interacteurs sur l'infection par BTV n'est mis en évidence par cette approche.

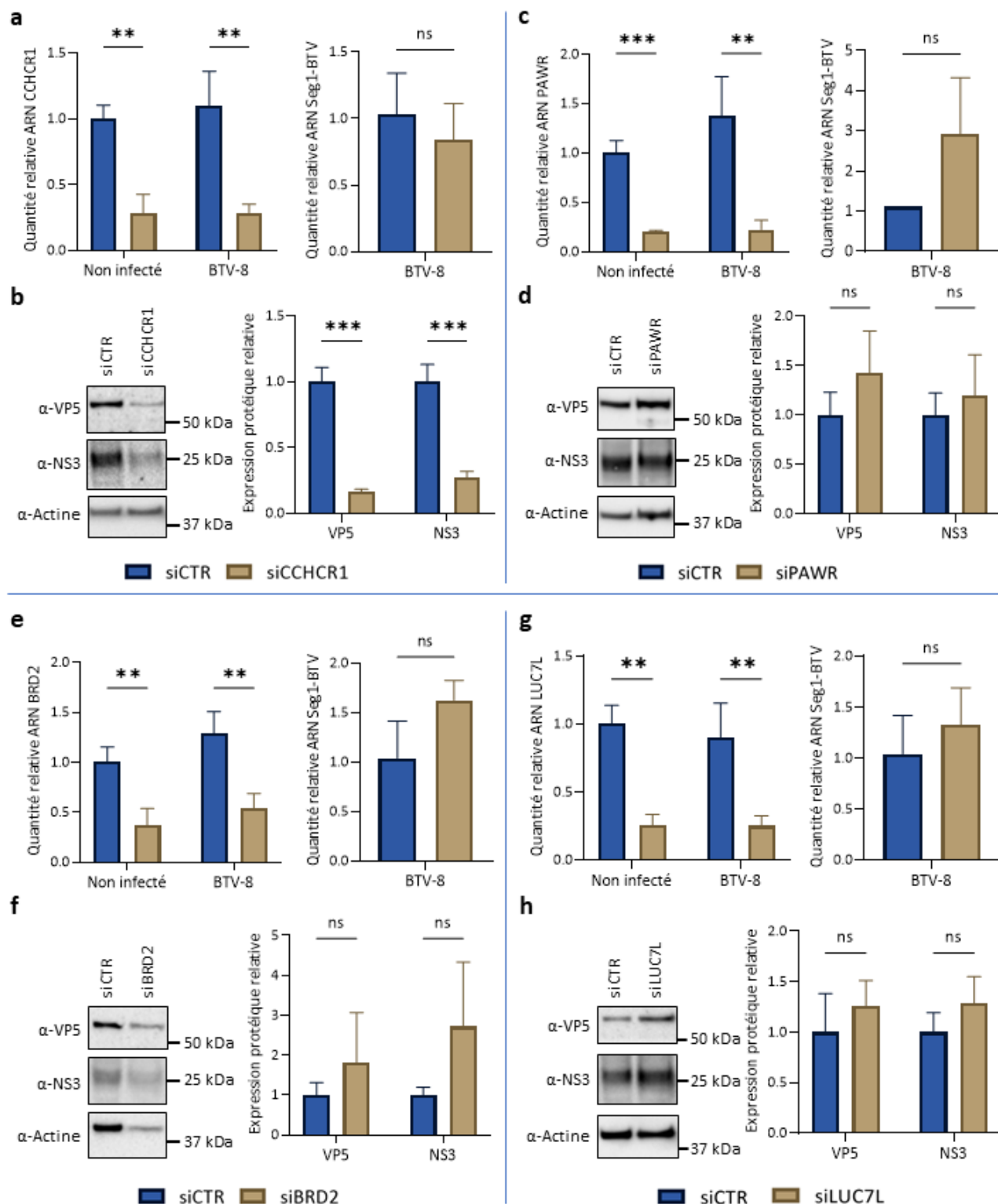


Figure 23 : Impact de l'inhibition d'expression des interacteurs bovins CCHCR1, PAWR, BRD2 et LUC7L sur l'infection BTV-8.

Des cellules BUCeC ont été transfectées avec 25nM de siRNA ciblant les gènes *CCHCR1*, *PAWR*, *BRD2* et *LUC7L* ou des siRNA non spécifiques comme contrôle (siCTR). Vingt-quatre heures après, les cellules ont été infectées par le BTV-8 à la MOI de 0,02. Après 24h d'infection, les surnageants des cellules ont été récoltés, les ARN totaux et les protéines totales ont été extraits. Les graphiques ont été obtenus à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 9.3.1) à partir des résultats d'une expérience comprenant des triplicats biologiques et étant représentative d'au moins deux expériences indépendantes. Un test statistique de *Student* non apparié a été appliqué : les résultats ont été considérés non significativement différents si $p > 0,05$ (ns), significativement différents si $p < 0,05$ avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$. Les barres d'erreur représentent les écarts types. L'effet de l'inhibition de CCHCR1 (a, b), de PAWR (c, d), de BRD2 (e, f) et de

LUC7L (**g, h**) sur l'infection par BTV-8 a été évalué : (a, c, e, g) L'expression de l'ARNm codant pour chaque gène cible et celui correspondant au segment 1 du BTV a été évaluée par RTqPCR. La quantité relative a été calculée en fonction de la condition contrôle (siCTR) et normalisée avec le gène *GAPDH*. (b, d, f, h) L'expression de VP5 et NS3 du BTV a été évaluée par *western blot*. L'intensité des bandes observées a été quantifiée à l'aide du logiciel imageJ. A partir de l'analyse d'image des triplicats biologiques, le taux d'expression a été calculé de manière relative par rapport à la condition contrôle (siCTR) et normalisée avec l'expression de l'actine.

4. Caractérisation de l'interaction NS4/WTAP

Comme montré précédemment, l'interaction entre NS4 et WTAP est la seule interaction identifiée comme spécifique au sérotype 8 du BTV. En outre, l'inhibition d'expression de WTAP dans les cellules bovines infectées par le BTV-8 entraîne une diminution de la production virale ainsi que de l'expression des antigènes viraux NS3 et VP5. La protéine WTAP semble donc jouer un rôle proviral pour l'infection à BTV-8. Son absence d'interaction avec la NS4 du BTV-27 pourrait expliquer en partie la différence de pathogénicité observée entre le sérotype 8 et le sérotype 27. C'est pourquoi, nous avons cherché à caractériser plus finement cette interaction.

4.1 Etude du degré de conservation de l'interaction

4.1.1 Degré de conservation de l'interaction au niveau de l'hôte

La capacité d'interaction observée entre la protéine bovine WTAP et la NS4 du BTV-8 mais pas avec celle du BTV-27 pourrait être liée à une spécificité d'hôte sachant que le BTV-27 a été isolé uniquement chez l'espèce caprine. La NS4 de BTV-27 serait alors susceptible d'interagir avec la forme caprine de WTAP alors que la NS4 du BTV-8 elle, le serait davantage avec la forme bovine. La comparaison des séquences protéiques de WTAP bovin et caprin montre une grande conservation entre les deux espèces, les deux formes ne différant que par 6 acides aminés (**Figure 24a**).

Aussi, la forme caprine de WTAP a été testée en interaction par GST *pull-down* avec les NS4 du BTV-8 et du BTV-27 (**Figure 24b**). La protéine WTAP caprine fusionnée à l'étiquette 3xFlag a bien été exprimée et détectée dans les lysats cellulaires (**Figure 24b**, panel bas). Les protéines virales ont été précipitées grâce à leur étiquette GST (**Figure 24b**, panel du milieu). WTAP caprin a été co-précipité avec la NS4 du BTV-8 mais très peu avec celle du BTV-27 (**Figure 24b**, panel haut).

La NS4 du BTV-27 n'est donc pas davantage capable d'interagir avec la forme caprine de WTAP par rapport à la forme bovine. Il n'y a pas de spécificité d'hôte expliquant la différence d'interaction de WTAP avec la NS4 du BTV-8 et celle du BTV-27.

a

WTAP-bovin	MTNEEPLPKKVRLESETDFKVMARDELILRWKQYEAYVQALEGKYTDLNSNDVTGLRESEE	60
WTAP-caprin	60
WTAP-bovin	KLKQQQESARRENILVMRLATKEQEMQECTTQIQYLKQVQQPSVAQLRSAMVDPAINLL	120
WTAP-caprinT.....	120
WTAP-bovin	FLKMKSELEQTKDKLEQAQNELSAWKFTPDSTGKGLMAKCRMLIQENQELGRQLSQGRI	180
WTAP-caprin	180
WTAP-bovin	AQLEAELALQKKYSEELKSSQDELNDFI IQLDEEVEGMQSTILVLQQQLKETRQQLAQYQ	240
WTAP-caprin	240
WTAP-bovin	QQQQAAGPSTSRRTTSSEPVGQAEATGKDCSRLANGPSNGSSSRQRTSGSGFHREGDTAE	300
WTAP-caprinP.....G.....	300
WTAP-bovin	DDFPSSPGNGNKASSSSEERTGRGGSSYVNQLSAGYESVDSPTGSENSLTHHSNDTDSSH	360
WTAP-caprinP.....	360
WTAP-bovin	DPQEEKPVSGKGNRTAASRHVQNGLDSSVNVQGSVL*	396
WTAP-caprinS.....S.....*	396

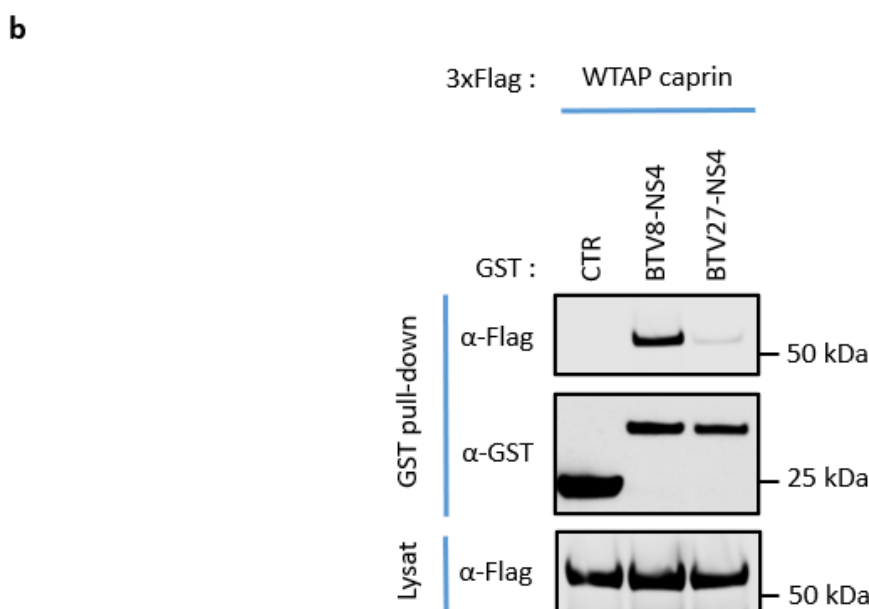


Figure 24 : Etude du degré de conservation de l'interaction entre les NS4 du BTV-8 et -27 et WTAP caprin.

(a) Comparaison des séquences en aa des formes bovine et caprine de la protéine cellulaire WTAP. L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du programme informatique Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

(b) Test d'interaction entre WTAP et NS4 par GST pull-down. Des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec 500 ng de vecteur exprimant la GST seule (contrôle négatif) ou fusionnée avec la NS4 du BTV-8 ou -27 et 500 ng de vecteur exprimant la protéine caprine WTAP fusionnée à une étiquette 3xFlag. Les lysats cellulaires sont récupérés 36 h après transfection et les complexes protéiques sont purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. Les protéines fusionnées à la GST et au 3xFlag sont détectées par western blot respectivement à l'aide d'un anticorps anti-GST et anti-Flag.

4.1.2 Degré de conservation de l'interaction au niveau du virus

L'interaction entre WTAP et NS4 ne semblant pas spécifique à un type d'hôte, la capacité d'interaction avec la NS4 du BTV-8 ou du BTV-27 pourrait s'expliquer par une spécificité liée au sérotype pathogène BTV-8. Aussi, l'étude du degré de conservation de cette interaction avec d'autres sérotypes classiques (pathogènes) et atypiques (non-pathogènes) a été faite en choisissant les NS4 du

BTV-1 et du BTV-4 pour les sérotypes classiques et les NS4 du BTV-25 et BTV-30 pour les sérotypes atypiques.

L'alignement des séquences en acides aminés des NS4 montre une grande conservation entre les trois sérotypes classiques. NS4 du BTV-1 présente deux mutations non synonymes par rapport à la séquence du BTV-8, N6S et P34L alors que la NS4 du BTV-4 ne diffère que d'un aa, K8R. En revanche, les trois séquences de NS4 des sérotypes atypiques BTV-27, -25 et -30 divergent davantage entre elles avec 8 à 11 résidus différents, la NS4 du BTV-30 possédant même deux aa supplémentaires en C-terminal. Les NS4 des sérotypes atypiques sont par ailleurs assez éloignées de la séquence NS4 de BTV-8 avec 17 à 21 résidus différents (**Figure 25a**). Les séquences des NS4 des sérotypes -27, -25 et -30 de BTV se distinguent bien du groupe des NS4 de sérotypes classiques BTV-8, -1 et -4.

Afin de déterminer s'il existe une spécificité d'interaction liée au sérotype de BTV, la protéine bovine WTAP a ensuite été testée en interaction avec l'ensemble de ces NS4. Pour ce faire, la méthode biochimique de GST *pull-down* a été choisie (**Figure 25b**). Les huit NS4 fusionnées à l'étiquette GST ont été efficacement exprimées et co-précipitées par affinité (**Figure 25b**, panel milieu). WTAP fusionnée à l'étiquette 3x-Flag s'est également bien exprimée (**Figure 25b**, panel bas). Elle a été co-purifiée avec les NS4 du BTV-8, -1, -25 et plus faiblement avec la NS4 du BTV-4. WTAP n'a été que très peu co-purifiée avec NS4 du BTV-27 et pas du tout avec NS4 du BTV-30 (**Figure 25b**, panel haut). Ceci montre donc la capacité de WTAP bovin à interagir préférentiellement avec des NS4 de sérotypes classiques, BTV-8, -1 et -4 mais aussi avec la NS4 d'un sérotype atypique, le BTV-25.

Ces résultats suggèrent donc que l'interaction entre WTAP et NS4 n'est pas spécifique au sérotype 8 du BTV ni même aux sérotypes classiques.

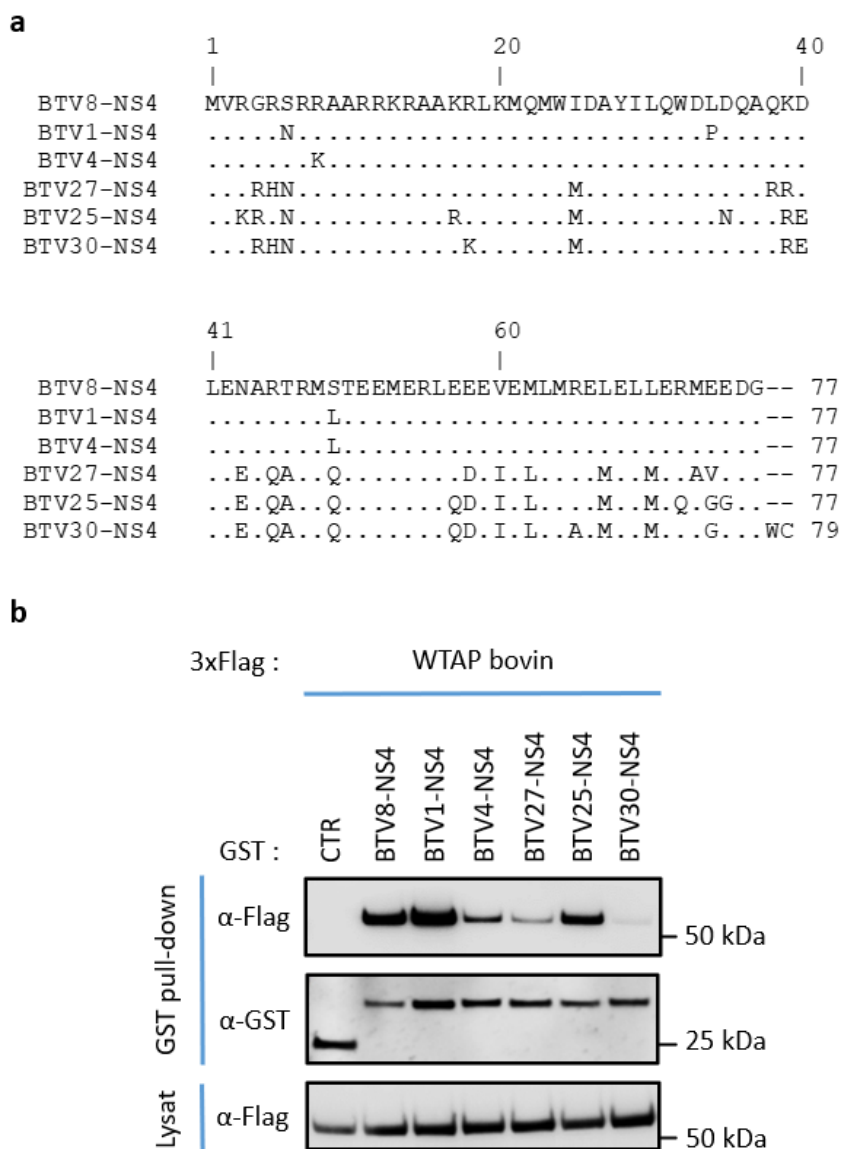


Figure 25 : Etude du degré de conservation de l'interaction entre WTAP bovin et les NS4 de sérotypes classiques et atypiques du BTV.

(a) Comparaison des séquences en acides aminés des protéines NS4 des sérotypes classiques 8, 1, 4 et des sérotypes atypiques 27, 25 et 30 du BTV. L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du programme informatique Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (b) Test de l'interaction entre WTAP et NS4 par GST pull-down. Des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec 500 ng de vecteur exprimant la GST seule (contrôle négatif) ou fusionnée avec la NS4 du BTV-8, -1, -4, -27, -25 ou -30 et 500 ng de vecteur exprimant la protéine bovine WTAP fusionnée à une étiquette 3xFlag. Les lysats cellulaires ont été récupérés 36 h après transfection et les complexes protéiques purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. Les protéines fusionnées à la GST et au 3xFlag ont été détectées respectivement par western blot à l'aide d'un anticorps anti-GST et anti-Flag. Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués en kiloDalton (kDa).

4.2 Identification de domaines protéiques d'interaction pour NS4 et WTAP

L'interaction entre WTAP et NS4 ne montrant pas de spécificité d'hôte ni de sérotype, la détermination des domaines protéiques essentiels à l'interaction pourrait permettre de comprendre les différences d'interaction de WTAP observées avec les NS4 du BTV-8 et du BTV-27.

4.2.1 Domaine minimum de NS4

Dans un premier temps et afin d'identifier aisément un domaine de NS4 du BTV-8 capable d'interagir avec WTAP-bovin, un test d'interaction en système levure avec une recombinaison par *gap-repair* a été réalisé. La séquence protéique de NS4 étant constituée de 77 acides aminés, un fragmentome a été généré tous les 22 résidus en tronquant la protéine du côté amino ou carboxy-terminal. Pour cela, des amorces sens et anti-sens ont été conçues tous les 66 nucléotides le long de la séquence de BTV8-NS4. Ces amorces ont été fusionnées à des séquences spécifiques permettant la recombinaison dans le vecteur pPC97-Gal4-BD (**Tableau 7**) linéarisé par restriction avec l'enzyme *SmaI*. A partir de 50 ng de matrice ADN (pDONR-NS4-BTV8), chaque fragment a été obtenu par PCR selon le protocole utilisant la HotStarTaq (Qiagen) et décrit en [section M&M 6.1.2](#).

Une souche de levure préalablement transformée avec le plasmide pPC86-Gal4-AD-WTAP, a été mise en culture puis, transformée avec chaque produit de PCR généré et codant pour un fragment de NS4 avec le vecteur pPC97 linéarisé. Après sélection des levures co-transformées sur un milieu sélectif -L/-W, celles-ci ont été resuspendues et redéposées en parallèle sur un milieu contrôle -L/-W et sur un milieu sélectif des interactions -L/-W/-H + 5mM 3-AT (**Figure 26a**).

La croissance de chaque levure co-transformée est bien observée sur le milieu contrôle -L/-W, montrant ainsi la co-expression de WTAP fusionnée à Gal4-AD et chaque domaine de NS4 fusionné à Gal4-BD. Sur le milieu sélectif -L/-W/-H + 5 mM 3-AT, seules les levures exprimant WTAP et NS4 entière (1-77) ou les domaines 1-55 et 22-55 ont été capables de croître. A l'inverse, les domaines de NS4 plus restreints 1-33, 1-11, 22-55, 22-33, 44-77, 44-55 et 66-77 n'ont pas permis la croissance des levures.

Bien qu'à lui seul il ne soit pas capable d'interagir avec WTAP, le domaine 22-55, commun aux domaines 1-55 et 22-77 qui interagissent avec WTAP, semble important à l'établissement de l'interaction (**Figure 26b**).

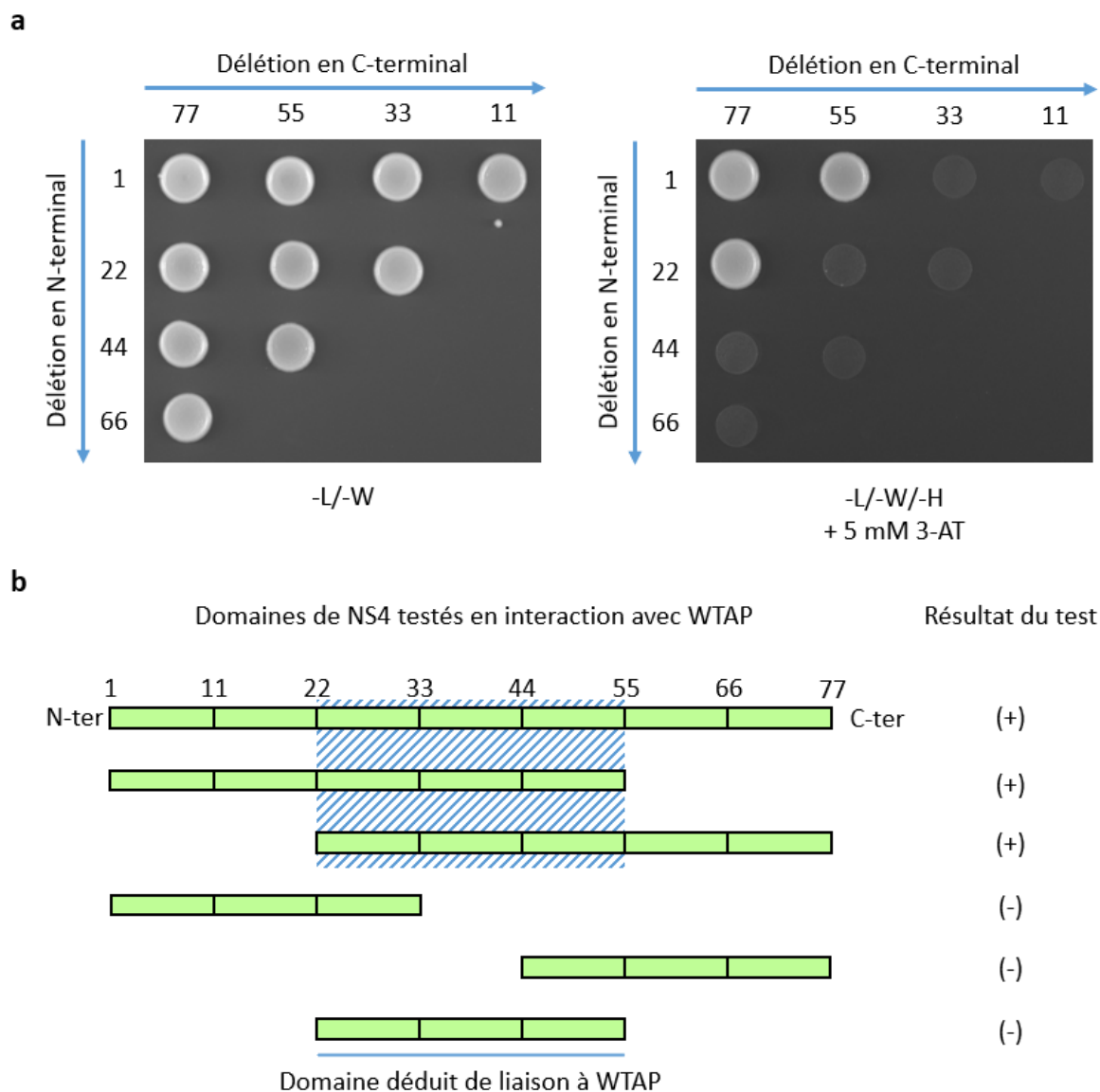


Figure 26 : Cartographie de la région d’interaction de NS4 du BTV-8 avec WTAP bovin par système Y2H.

(a) Différents fragments de NS4 du BTV-8 tronqués de séquences amino ou carboxy-terminales ont été obtenus par PCR et recombinés avec le vecteur pPC97-Gal4-BD dans des levures exprimant WTAP bovin entière fusionnée au domaine Gal4-AD. L’axe vertical représente le premier aa et l’axe horizontal le dernier aa de chaque fragment de NS4 testé. Les levures co-transformées sont ensuite étalées sur milieux -L/-W et -L/-W/-H supplémenté avec 5mM de 3-AT pour tester l’interaction, comme dans la Figure 20. (b) Représentation schématique du domaine minimum de NS4 identifié comme essentiel à l’interaction avec WTAP.

Afin de confirmer l’importance du domaine protéique 22-55 de NS4 du BTV-8 pour son interaction avec WTAP bovin, une protéine chimérique a été générée en remplaçant la séquence 22-55 de NS4 du BTV-27 par celle de NS4 du BTV-8 (section 1). Cette chimère nommée BTV27-NS4^{22-55BTV8-NS4} a été testée en interaction avec WTAP en comparaison avec les formes sauvages de BTV8-NS4 et BTV27-NS4.

Un premier test par double-hybride en levure a été réalisé (Figure 27a). Des levures ont ainsi été successivement transformées avec le pPC86-Gal4-AD vide ou codant pour WTAP-bovin puis avec le pPC97-Gal4-BD vide ou codant pour la BTV8-NS4, BTV27-NS4, BTV27-NS4^{22-55BTV8-NS4} selon le protocole décrit en section M&M 7.2.1. L’efficacité de co-transformation des levures a été vérifiée sur

milieu de culture -L/-W (**Figure 27a**, panel haut) et l'interaction testée sur milieu -L/-W/-H + 3-AT (**Figure 27a**, panel bas). Comme attendu, l'interaction entre WTAP et NS4 du BTV-8 est observée alors qu'elle ne l'est pas avec NS4 du BTV-27. Le test avec la protéine chimère NS4^{22-55BTV8-NS4} a mis en évidence une interaction avec WTAP.

Cette interaction a été vérifiée par *GST pull-down* (**Figure 27b**). La protéine chimère BTV27-NS4^{22-55BTV8-NS4} fusionnée à la GST a été purifiée à l'aide de billes de glutathion sépharose et détectée de manière comparable aux NS4 du BTV-8 et du BTV-27 (**Figure 27b**, panel milieu). WTAP fusionnée à l'étiquette 3xFlag a été co-précipitée avec la forme sauvage de NS4 du BTV-8 ainsi qu'avec la protéine chimère BTV27-NS4^{22-55BTV8-NS4} (**Figure 27b**, panel haut).

Les résultats de ces deux approches confirment l'importance du domaine 22-55 de BTV8-NS4 dans l'établissement de l'interaction avec WTAP. Cette séquence est donc essentielle pour établir l'interaction dans un contexte où la protéine NS4 est sous sa forme entière.

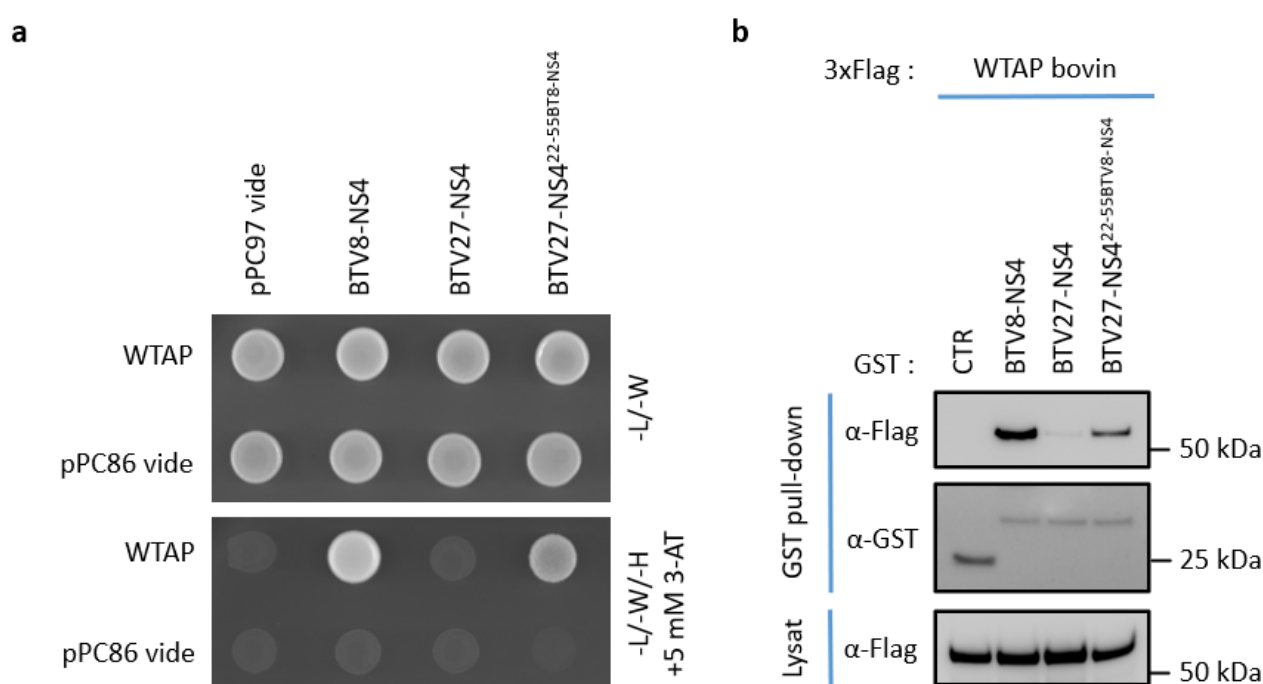


Figure 27 : Détermination de l'importance du domaine 22-55 de BTV8-NS4 dans l'interaction avec WTAP bovin.

(a) Test d'interaction entre la protéine chimère BTV27-NS4^{22-55BTV8-NS4} et WTAP bovin en système Y2H. Des levures ont été co-transformées avec le vecteur pPC86-Gal4-AD vide ou intégrant WTAP et le vecteur pPC97-Gal4-BD intégrant la séquence BTV8-NS4, BTV27-NS4 ou BTV27-NS4^{22-55BTV8-NS4}. Les levures ont été ensemencées sur milieu sélectif de co-transformation -L/-W (panel haut) et sur milieu sélectif de l'interaction -L/-W/-H + 5mM de 3-AT (panel bas). (b) Test d'interaction entre la protéine chimérique BTV27-NS4^{22-55BTV8-NS4} et WTAP par la méthode de *GST pull-down* en comparaison avec les NS4 sauvages du BTV-8 et BTV-27.

4.2.2 Domaine minimum de WTAP bovin

Comme pour la détermination du domaine minimum de NS4 essentiel à l'interaction, un fragmentome de WTAP bovin a été réalisé en système levure. WTAP étant composée de 396 acides aminés, des domaines tronqués tous les 50 résidus ont été générés. Des amorces sens et anti-sens ont ainsi été conçues tous les 150 nucléotides le long de la séquence bovine de WTAP et fusionnées aux séquences permettant la recombinaison dans le vecteur pPC86-Gal4-AD linéarisé par restriction avec

l'enzyme *SmaI* (Tableau 7). A partir de 50 ng de matrice ADN (pDONR-WTAP), chaque séquence codant un fragment a été obtenue par PCR.

Une souche de levure transformée avec le plasmide pPC97-Gal4-BD-BTV8-NS4 a été préalablement sélectionnée sur un milieu dépourvu de leucine et remise en culture pour être co-transformée avec chaque produit de PCR codant pour un domaine de WTAP et le vecteur pPC86-Gal4-AD linéarisé. Les levures co-transformées ont été étalées sur milieux sélectifs comme décrit précédemment (Figure 28a). La croissance de toutes les levures est observée sur le milieu sélectif -L/-W, montrant ainsi la co-expression de BTV8-NS4 fusionnée à Gal4-BD et chaque domaine de WTAP fusionné à Gal4-AD (Figure 28a, panel gauche). Sur le milieu -L/-W/-H + 5 mM 3-AT (Figure 28a, panel droit), les levures exprimant les domaines de WTAP 1-396 à 1-250, 51-396 à 51-250, 101-396 à 101-250, 151-396 à 151-250 ont été capables de se développer. Celles exprimant les domaines plus petits et délétés davantage du côté amino comme carboxy-terminal n'ont pas été capables de croître.

Ces résultats permettent de définir le domaine 151-250 de WTAP comme le domaine minimal d'interaction avec la NS4 du BTV-8 (Figure 28b).

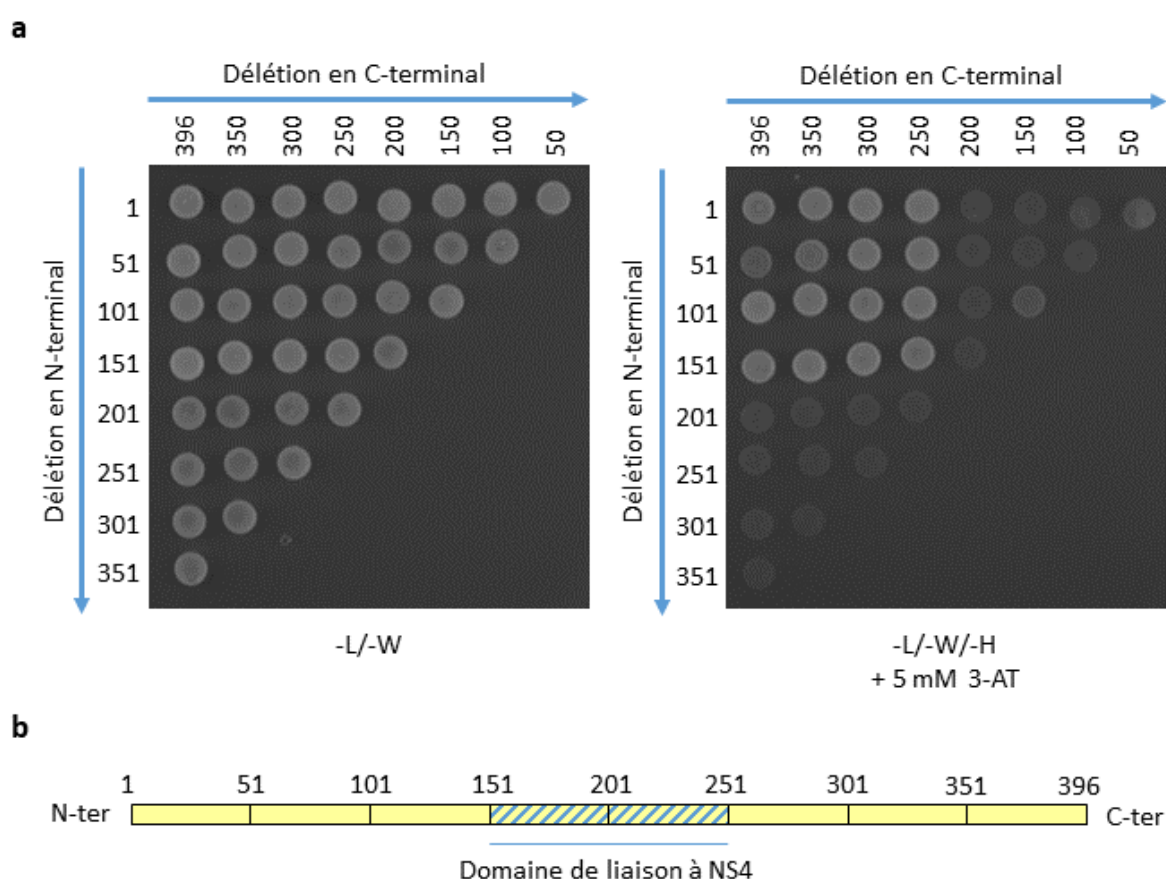


Figure 28 : Détermination du domaine de WTAP minimum à l'interaction avec NS4 du BTV8.

(a) Cartographie de la région d'interaction de la protéine bovine WTAP avec NS4 du BTV-8 par système Y2H. Les différents fragments de WTAP ont été obtenus par PCR et recombinaison avec le vecteur pPC86-Gal4-AD par *gap-repair* en levure exprimant déjà NS4 entière fusionnée au domaine Gal4-BD. L'axe vertical représente le premier aa et l'axe horizontal le dernier aa de chaque fragment de WTAP testé. Les levures co-transformées avec les vecteurs pPC86-Gal4-AD et pPC97-Gal4-BD ont la capacité de croître sur milieu -L/-W. La reconstitution du domaine complet Gal4 par interaction des protéines fusionnées au domaine AD et BD permet la croissance des levures sur milieu -L/-W/-H supplémenté avec 5mM de 3-AT. (b) Représentation schématique du domaine minimum de WTAP essentiel à l'interaction avec NS4.

4.3 Détermination de la localisation cellulaire de l'interaction

WTAP est décrite comme une protéine nucléaire qui forme un complexe protéique avec notamment la protéine METTL3 [100]. NS4 du BTV est connue pour avoir une localisation nucléaire et nucléolaire [77]. Cependant dans certaines conditions expérimentales elle a également été observée dans le cytoplasme [75].

L'interaction entre NS4 du BTV-8 et WTAP bovin a été mise en évidence par double-hybride en levure et par GST *pull-down*. Ces approches ne permettent cependant pas de déterminer la localisation subcellulaire de cette interaction. Aussi, la localisation de l'interaction de NS4 du BTV-8 avec la forme endogène de WTAP a été étudiée par un essai de ligature de proximité (*Proximity Ligation Assay*, PLA) dans les cellules bovines BUcEC transfectées avec un plasmide codant pour la NS4 fusionnée à la GFP. Cette technique permet de mettre en évidence une localisation à moins de 40 nm des deux partenaires protéiques par l'émission d'un signal au point de colocalisation et visible au microscope à fluorescence. L'interaction directe entre WTAP et METTL3 ayant été décrite [100], celle-ci a été choisie comme contrôle positif de PLA.

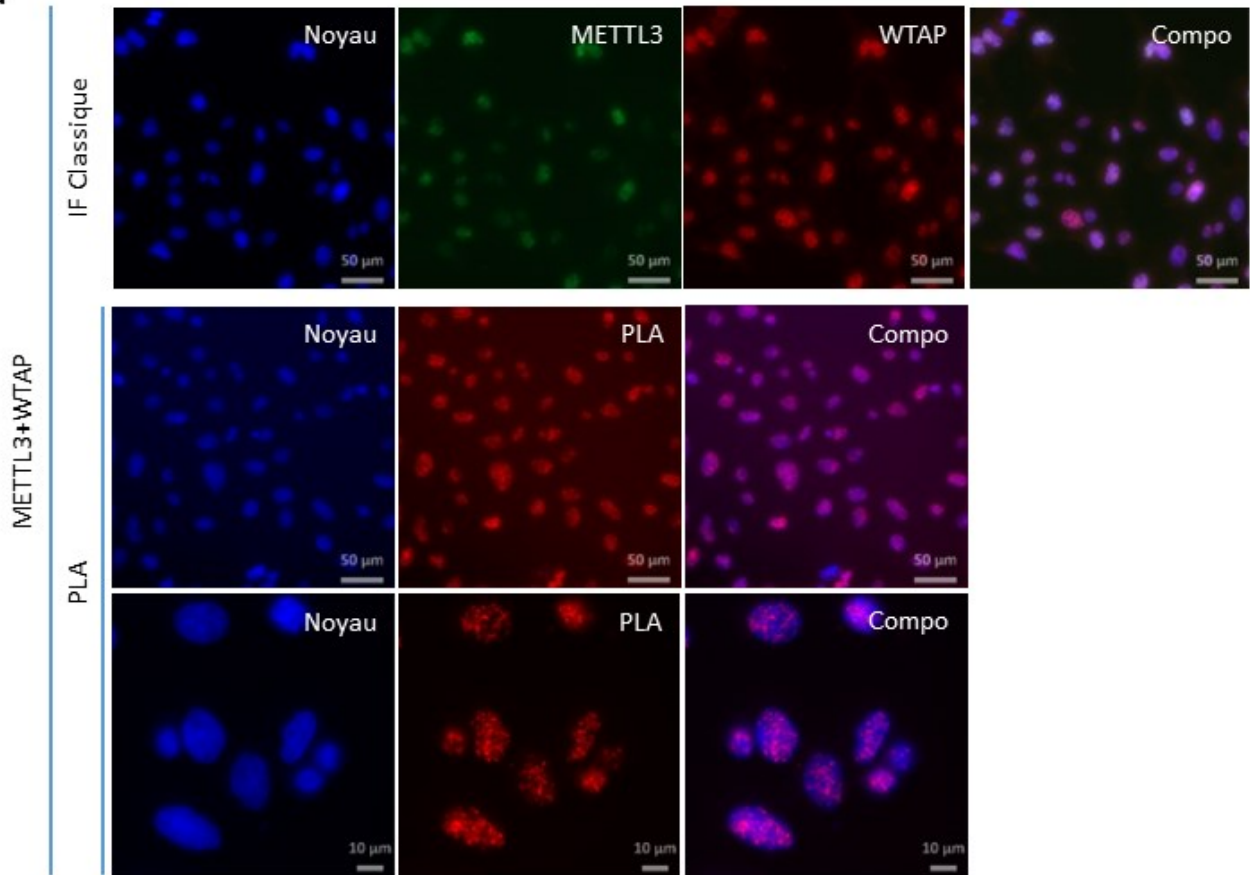
Dans un premier temps, l'expression des protéines étudiées et leur détection par immunofluorescence classique (IF) a été vérifiée. Ainsi, dans des cellules BUcEC non transfectées, le co-marquage de WTAP et METTL3 endogènes a été réalisé à l'aide d'anticorps spécifiques anti-WTAP et anti-METTL3 et d'anticorps secondaires couplés à des fluorophores (**Figure 29a**, panel haut). Dans les cellules transfectées avec peGFP-NS4-BTV8, un marquage de WTAP endogène a été réalisé (**Figure 29b**, panel haut).

Par IF, METTL3 et WTAP ont bien été détectées, confirmant leur expression dans les cellules BUcEC et l'efficacité des anticorps utilisés. Comme attendu, ces deux protéines présentent une localisation nucléaire et ne semblent pas présentes au nucléole (**Figure 29a**, panel haut). Dans les cellules exprimant NS4 fusionnée à la GFP, WTAP présente la même localisation que celle observée dans les cellules BUcEC non transfectées. NS4 fusionnée à la GFP présente elle, une localisation nucléaire et surtout nucléolaire (**Figure 29b**, panel haut).

Dans un second temps, pour le test PLA, le même co-marquage primaire METTL3/WTAP que pour l'IF a été réalisé puis le marquage secondaire a été fait avec des anticorps secondaires anti-anticorps de lapin et anti-anticorps de souris couplés aux sondes PLA (**Figure 29a**, panels milieu et bas). Après les étapes de ligature et d'amplification, les noyaux des cellules ont été marqués au Hoechst et les cellules observées au microscope à épi-fluorescence. Des points de fluorescence correspondant à un test PLA positif sont observés au niveau des noyaux. L'interaction METTL3/WTAP nous servant ici de contrôle positif est bien mise en évidence par cette approche. L'observation à plus fort grossissement (**Figure 29a**, panel bas) montre bien que cette interaction a lieu dans le noyau mais en dehors des nucléoles, ceci correspondant à la localisation des deux protéines observées par IF.

Pour le test de colocalisation entre NS4 et WTAP, un marquage primaire utilisant des anticorps anti-WTAP et anti-NS4 a été réalisé avant le marquage secondaire avec les anticorps couplés aux sondes PLA puis la ligature des sondes et l'amplification du signal (**Figure 29b**, panel milieu et bas). La visualisation du test met en évidence des points rouges au niveau du noyau mais en dehors des nucléoles. WTAP et NS4 se situent donc à moins de 40 nm l'une de l'autre dans le compartiment nucléaire où elles pourraient donc interagir.

a



b

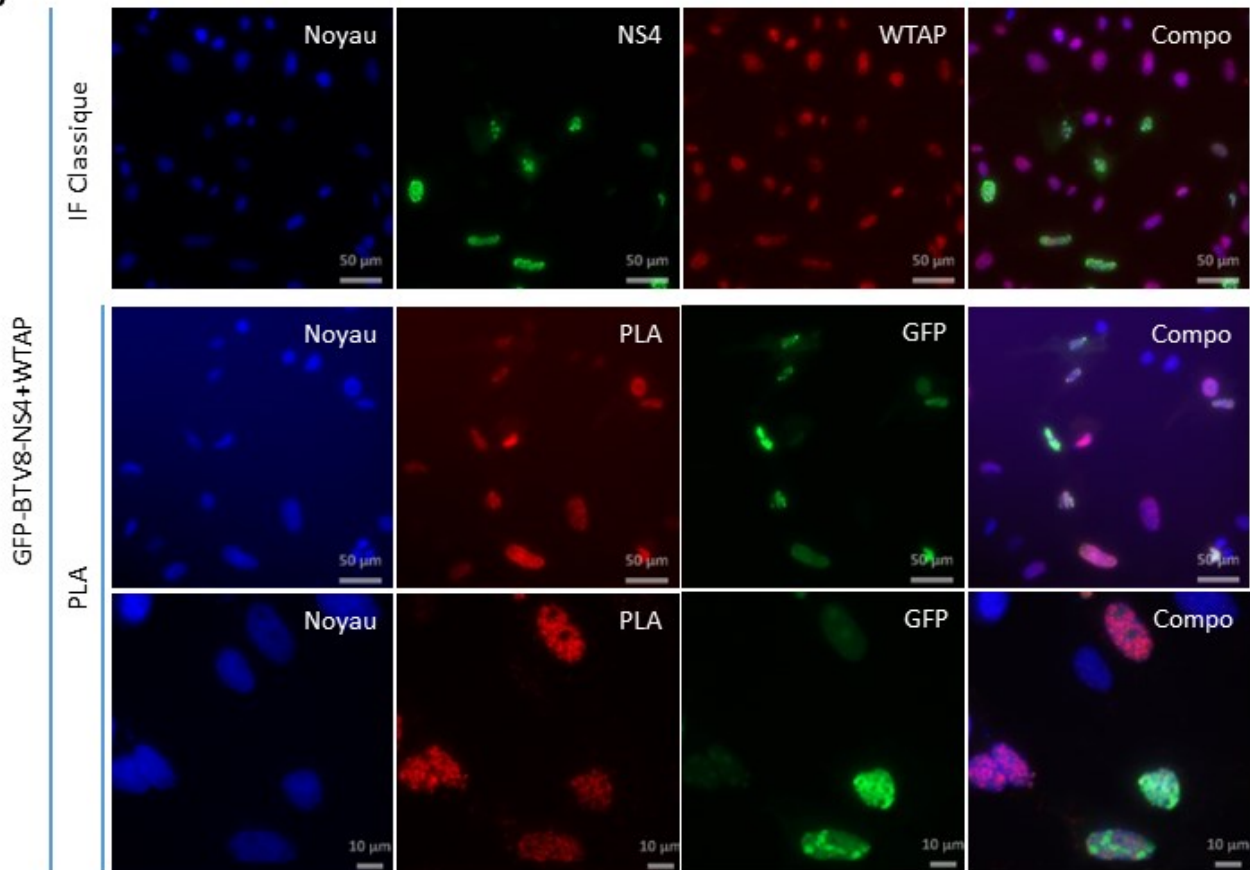


Figure 29 : Etude de co-localisation de WTAP et NS4 par la méthode de *Proximity Ligation Assay* (PLA).

(a) Des cellules BUcEC ont étéensemencées puis fixées à la PFA 48 h après. La détection et la localisation des protéines METTL3 et WTAP a été vérifiée par une méthode d'immunofluorescence classique (panel haut) avec un anticorps lapin anti-METTL3, un anticorps souris anti-WTAP et les anticorps secondaires anti-anticorps de lapin conjugué Alexa Fluor™ 488 et anti-anticorps de souris conjugué Alexa Fluor™ 555. Les noyaux des cellules ont été marqués au Hoechst. La barre d'échelle correspond à 50 µm. Le test de PLA entre METTL3 et WTAP a été réalisé à l'aide du kit Duolink® in Situ (panel milieu et bas). L'immunomarquage primaire des deux protéines a été réalisé dans les mêmes conditions que pour l'IF classique. Le marquage secondaire a ensuite été réalisé avec deux anticorps secondaires anti-anticorps de lapin et anti-anticorps de souris, chacun couplé à un oligonucléotide et formant les sondes PLA lapin PLUS et souris MINUS. Après une étape de ligature et d'amplification, les noyaux ont été marqués au Hoechst et les cellules ont été visualisées au microscope à épifluorescence.

(b) Des cellules BUcEC ont étéensemencées et, 24 h après, transfectées avec peGFP-BTV8-NS4. Les cellules ont été fixées à la PFA après 24 h d'incubation supplémentaires. La détection de WTAP dans les cellules exprimant la NS4 fusionnée à la GFP a été vérifiée par immunofluorescence (panel haut) avec l'anticorps souris anti-WTAP et l'anticorps secondaire anti-anticorps de souris conjugué Alexa Fluor™ 555. Les noyaux des cellules ont été marqués au Hoechst. La barre d'échelle correspond à 50 µm. Le test PLA entre NS4 et WTAP a été réalisé selon la même méthode qu'en (a) avec le marquage primaire de GFP-NS4 avec un anticorps lapin anti-NS4 dans les cellules BUcEC transfectées et fixées comme dans le panel haut. **(a et b)** L'émission d'un signal PLA met en évidence la proximité à moins de 40 nm des deux protéines d'intérêt immunomarquées. Les barres d'échelle de la ligne centrale correspondent à 50 µm et de la ligne basse à 10 µm.

5. Validation et comparaison des interactions entre les protéines bovines et les protéines NS5, NS5a du BTV-8, NS5 du BTV-27

A l'instar des interactions impliquant NS4, celles impliquant NS5/NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27, identifiées au moins trois fois lors du crible par double-hybride en levure, ont également été étudiées (**Tableau 5**). Dans un premier temps, l'ensemble de ces interactions a été retesté en système levure ainsi que par une méthode biochimique, et cela de manière comparative entre BTV8-NS5, BTV8-NS5a et BTV27-NS5. Dans un second temps, l'étude du rôle de ces interactions dans l'infection par le BTV-8 a été réalisée par inhibition de l'expression des interacteurs cellulaires de NS5 et NS5a.

5.1 Par double-hybride en levure

Suite au crible Y2H ayant permis l'identification sans à priori des interacteurs de NS5/NS5a du BTV-8 et de NS5 du BTV-27 (**Tableau 5**), et comme pour les interacteurs cellulaires de NS4, la séquence minimale et la séquence la plus longue des proies cellulaires identifiées trois fois ou plus ont été sélectionnées. C'est ainsi que les protéines bovines C1QBP, MEGF6, GRN, hnRNPK et MATN2 ont été testées en interaction avec NS5 et NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27 (**Figure 30**).

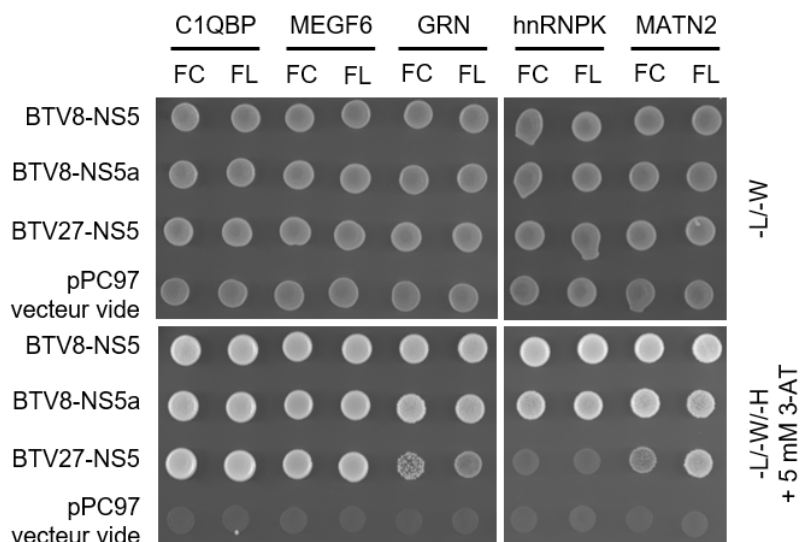
Afin de réaliser ces tests d'interaction, la même approche que pour les interacteurs de NS4 a été utilisée (**section 2.1**). Les levures co-transformées avec les constructions en pPC97/pPC86 ont été sélectionnées sur milieu (-L/-W) (**Figure 30a**, panel haut), et d'autre part sur milieu (-L/-W/-H + 5 mM 3-AT) pour tester l'interaction entre appât et proie via la transactivation du gène *HIS3* (**Figure 30a**, panel bas). Comme attendu d'après les résultats de la recherche effectuée sans à priori, les interactions entre NS5 du BTV-8 et les protéines bovines MEGF6, GRN, hnRNPK et MATN2 sont ici confirmées avec leurs formes courtes et longues. C'est également le cas pour l'interaction de NS5a du BTV-8 avec C1QBP, hnRNPK et MATN2, ainsi que pour l'interaction de NS5 du BTV-27 avec C1QBP, MEGF6 et MATN2 (**Figure 30a**). L'étude comparative met en évidence des interactions supplémentaires entre NS5 du BTV-8 et C1QBP, ainsi qu'entre NS5 du BTV-27 et GRN, et enfin entre

la NS5a du BTV-8 et MEGF6 et GRN. Seule l'interaction entre hnRNPK et NS5/NS5a du BTV-8 semble spécifique de ce sérotype, les autres interactions étant partagées avec NS5 du BTV-27 (**Figure 30b**).

Ainsi, pour NS5/NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27 ont été identifié :

- des interacteurs cellulaires bovins communs pour les trois variants de NS5 : C1QBP, MEGF6, GRN et MATN2
- un interacteur cellulaire spécifique au sérotype 8 : hnRNPK

a



b

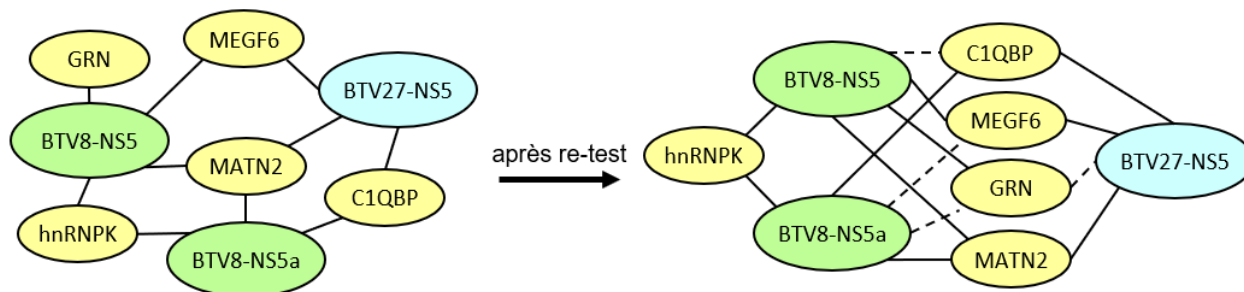


Figure 30 : Validation et comparaison des interactions entre les protéines cellulaires bovines et NS5/ NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27 par le système de double-hybride en levure.

(a) Des levures exprimant NS5 ou NS5a de BTV-8 ou NS5 du BTV-27 fusionnées au domaine Gal4-BD ont été co-transformées avec des produits de PCR codant la forme la plus courte (FC) et la forme la plus longue (FL) de chaque proie cellulaire, comme indiquée en présence du plasmide pPC86, pour permettre leur recombinaison et expression en fusion avec le domaine Gal4-AD directement dans la levure. Les levures ont été étalées respectivement sur milieux -L/-W comme contrôle de co-transformation et -L/-W/-H comprenant 5mM de 3-AT pour tester l'interaction entre appât et proie par transactivation du gène *HIS3*. (b) Les interactions de NS5/NS5a des BTV-8/27 avec leurs proies cellulaires respectives ont été représentées sous forme de cartes à l'aide du logiciel Cytoscape (version 3.9.0). Les interactions obtenues lors des cribles apparaissent sous forme de traits pleins. Les traits pointillés représentent les interactions nouvellement identifiées lors du test illustré en (a).

5.2 Par GST pull-down

Les protéines bovines hnRNPK, C1QBP et GRN fusionnées à l'étiquette 3xFlag ont été testées de manière comparative en interaction avec NS5/NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27 fusionnées elles,

à l'étiquette GST par la méthode de GST *pull-down*. Des cellules HEK293T co-transfectées avec les constructions exprimant l'étiquette 3xFlag fusionnée à hnRNPK, C1QBP ou GRN et les constructions exprimant la GST seule ou fusionnée avec BTV8-NS5, BTV8-NS5a ou BTV27-NS5 ont été lysées 36 heures après. Les lysats totaux et les complexes protéiques purifiés sur billes de glutathion sépharose ont été migrés sur gel *SDS-PAGE* puis analysés par *western blot* avec des anticorps anti-GST ou anti-Flag (**Figure 31**).

Les protéines hnRNPK, C1QBP et GRN ont été correctement exprimées et détectées dans les lysats totaux (**Figure 31**, panel bas). Les protéines GST seules et fusionnées à la NS5, NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27 ont été correctement précipitées (**Figure 31**, panel milieu). L'analyse par *western blot* des complexes protéiques montre que les protéines hnRNPK et GRN ont été co-purifiées de manière aspécifique avec la GST seule ou avec les billes de glutathion sépharose. Aussi, il n'est pas possible de conclure quant à leur interaction ou non avec BTV8-NS5, BTV8-NS5a et BTV27-NS5. La protéine C1QBP a été co-purifiée avec NS5 et NS5a du BTV-8 mais également avec la NS5 du BTV-27.

La méthode de GST *pull-down* permet donc de valider l'interaction entre C1QBP et NS5 du BTV. En accord avec les résultats obtenus en système levure, cette interaction est conservée avec la forme plus courte de NS5 du BTV-8, NS5a et avec NS5 du BTV-27.

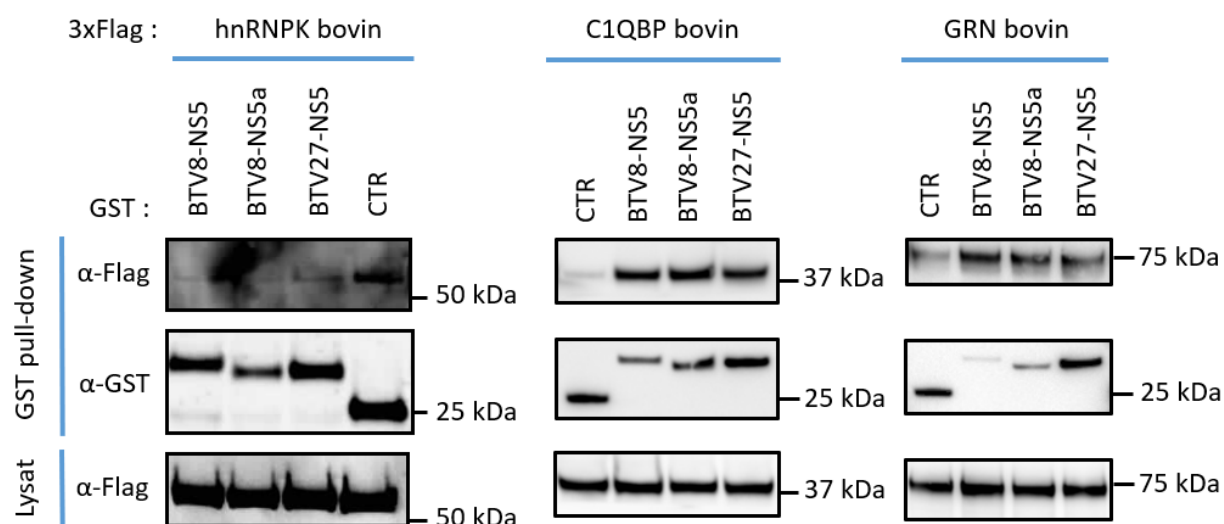


Figure 31 : Test et comparaison des interactions entre les protéines cellulaires bovines et NS5/NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27 par la méthode de GST *pull-down*.

Des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec 500 ng de vecteur exprimant la GST seule (contrôle négatif) ou fusionnée avec NS5 ou NS5a du BTV-8 ou NS5 du BTV-27 et 500 ng de vecteur exprimant l'une des protéines bovines sous sa forme entière et fusionnée à une étiquette 3xFlag. Les cellules ont été lysées 36 heures après transfection et les complexes protéiques ont été purifiés à l'aide de billes de glutathion sépharose. L'expression dans les lysats totaux des protéines fusionnées au 3xFlag (panel du bas), la co-purification des protéines fusionnées à la GST (panel du milieu) et des protéines fusionnées au 3xFlag (panel du haut) a été analysée par *western blot*. Les protéines fusionnées à la GST et au 3xFlag ont été détectées respectivement à l'aide d'un anticorps anti-GST et anti-Flag. Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués en kiloDalton (kDa).

6. Etude du rôle des interacteurs cellulaires bovins de NS5 lors de l'infection par le BTV-8

Afin de déterminer le rôle des interactions établies entre NS5 du BTV et les protéines cellulaires bovines identifiées précédemment, l'impact de l'inhibition de ces protéines cellulaires sur l'infection par BTV a été évalué. La même approche que pour les interacteurs de NS4 a été suivie en inhibant l'expression des protéines d'intérêt par transfection des cellules BUcEC avec des siRNA spécifiques avant leur infection par le BTV-8 (section 3).

En amont de l'étude présentée ici, l'efficacité de l'inhibition de l'expression des gènes par les siRNA a été évaluée. L'inhibition de MATN2 et MEGF6 par transfection des siRNA ne s'est pas révélée assez efficace, le rôle de ces interacteurs n'a donc pas pu être évalué. L'impact de l'inhibition d'expression des protéines hnRNPK, C1QBP et GRN a été étudié. Seuls les résultats ayant été confirmés par deux expériences menées indépendamment sont présentés ci-dessous, ce qui a amené à écarter les résultats obtenus pour GRN.

La transfection des cellules bovines avec les siRNA hnRNPK a permis de diminuer la quantité d'ARN codant pour hnRNPK de plus de 90%. D'autre part, l'infection des cellules par BTV-8 n'a pas induit de modulation significative de l'expression de hnRNPK (**Figure 32a**-graphique gauche). Dans les cellules dont l'expression de hnRNPK est bloquée, la quantité d'ARN viral détectée suite à l'infection par le BTV-8 est très légèrement augmentée par rapport aux cellules transfectées avec les siCTR, mais cette tendance n'est pas significative (**Figure 32a**-graphique droite). Dans les cellules n'exprimant plus hnRNPK, le taux d'expression de VP5 et NS3 est également légèrement augmenté sans que cela soit statistiquement significatif (**Figure 32b**). Bien qu'une tendance à l'augmentation de la réplication virale et de l'expression des protéines du BTV soit observée, l'inhibition de l'expression de hnRNPK dans les cellules bovines ne montre pas d'effet net sur l'infection par le BTV-8.

La quantité d'ARN codant pour C1QBP a été diminuée d'environ 85% dans les cellules bovines transfectées avec les siC1QBP. Aucune différence de taux d'ARN messager codant C1QBP n'est mise en évidence entre les cellules non infectées et infectées (**Figure 32c**-graphique gauche). Bien que la quantité d'ARN viral semble supérieure dans les cellules transfectées par les siC1QBP par rapport à celles transfectées avec les siCTR, cette différence n'est pas significative (**Figure 32c**-graphique droit). En revanche, l'expression des protéines virales est plus importante dans les cellules dont l'expression de C1QBP est bloquée, surtout celle de VP5 qui est trois fois plus exprimée (**Figure 32d**). L'inhibition de C1QBP augmentant l'expression des protéines virales semble donc favoriser l'infection par BTV.

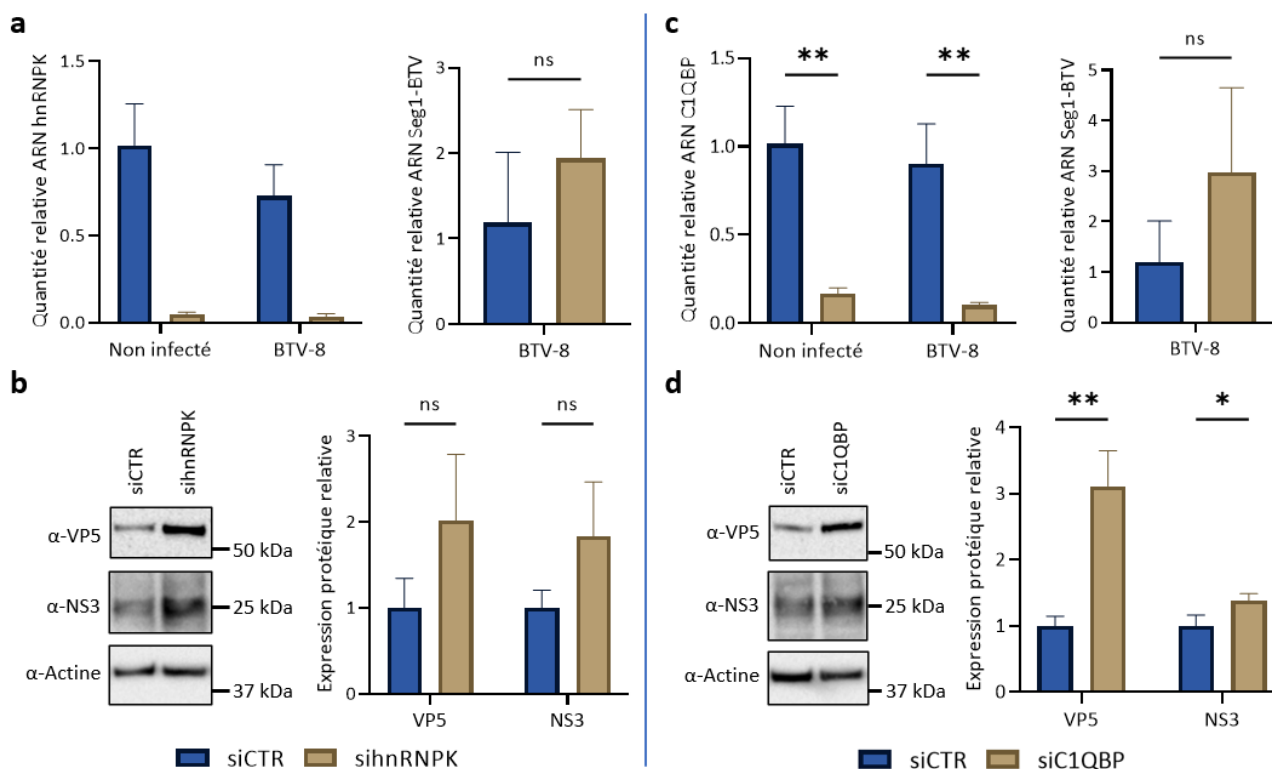


Figure 32 : Impact de l'inhibition d'expression des interacteurs bovins hnRNPk et C1QBP sur l'infection BTV-8.

Des cellules BUcEC ont été transfectées avec 25nM de siRNA ciblant les gènes *hnRNPk* et *C1QBP* ou des siRNA non spécifiques comme contrôle (siCTR). Vingt-quatre heures après, les cellules ont été infectées par le BTV-8 à la MOI de 0,02. Après 24 h d'infection, les surnageants des cellules ont été récoltés, les ARN totaux et les protéines totales ont été extraits. Les graphiques ont été obtenus à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 9.3.1) à partir des résultats d'une expérience comprenant des triplicats biologiques et étant représentative d'au moins deux expériences indépendantes. Un test statistique de *Student* non apparié a été appliqué : les résultats ont été considérés non significativement différents si $p > 0,05$ (ns), significativement différents si $p < 0,05$ avec $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ et $****p < 0,0001$. Les barres d'erreur représentent les écarts types. L'effet de l'inhibition de hnRNPk (**a,b**) et de C1QBP (**c, d**) sur l'infection par BTV-8 a été évalué : (a, c) L'expression de l'ARNm codant pour chaque gène cible et celui correspondant au segment 1 du BTV a été évaluée par RTqPCR. La quantité relative a été calculée en fonction de la condition contrôle (siCTR) et normalisée avec le gène *GAPDH*. (b, d) L'expression de VP5 et NS3 du BTV a été évaluée par western blot. Le taux d'expression a été calculé de manière relative par rapport à la condition contrôle (siCTR) et normalisée avec l'expression de l'actine.

Discussion

A travers ce projet, nous avons pu identifier des partenaires cellulaires bovins interagissant avec les protéines NS4 et NS5 du virus de la fièvre catarrhale ovine. Nous avons également pu mettre en évidence que certains d'entre eux modulaient l'infection virale et, enfin nous avons caractérisé plus finement l'interaction de la protéine virale NS4 avec la protéine bovine WTAP.

1. Validation des interactions

1.1 Clonage des interacteurs

Les séquences codantes pour les protéines cellulaires BRD2, LUC7L, MAPK7, MEGF6 et MATN2, partenaires de NS4 ou NS5 identifiés par double-hybride en levure, n'ont pas pu être amplifiées à partir de la banque d'ADN complémentaires issue des cellules bovines MDBK. Ceci pourrait être dû à une trop faible représentation de ces séquences dans la banque. Nous n'avons pas d'informations concernant la diversité de cette banque, aussi son analyse par séquençage à haut débit permettrait de connaître la représentation des ORFs d'intérêt. Nous envisageons d'insérer ces ORFs dans le vecteur plasmidique pDONR par synthèse de gène auprès d'un prestataire. Nous pourrions alors les sous-cloner dans les vecteurs de destination adéquats et ainsi étudier leur interaction avec NS4 ou NS5.

1.2 Comparaison des tests d'interaction par Y2H et GST pull-down

1.2.1 Tests d'interaction par Y2H

Toutes les interactions identifiées lors des cribles par système de double-hybride en levure (Y2H) ont été confirmées par le test binaire en Y2H. Pour chaque protéine cellulaire, son interaction avec NS4 ou NS5/NS5a a été validée avec sa forme courte et sa forme longue.

Le test binaire des interactions mené de manière comparative entre les protéines du BTV-8 et du BTV-27 a montré l'intérêt de pouvoir mettre en évidence des interactions non retrouvées dans les cribles. Ainsi, bien que ces interactions n'aient pas été identifiées initialement, 4 interacteurs sur les 9 ont été trouvés communs aux deux variants de NS4 ; les protéines PAWR, KANSL2, LUC7L et CCHCR1. Quatre interacteurs se révèlent spécifiques au sérotype 8 du BTV ; WTAP, AATF, KIF12 et BRD2 et un spécifique du BTV-27 ; MAPK7. En ce qui concerne les interactions étudiées avec les protéines NS5 et NS5a du BTV, seule l'interaction avec la protéine cellulaire hnRNPk s'est révélée spécifique du sérotype 8, les autres étant partagées entre le BTV-8 et le BTV-27 à savoir C1QBP, GRN, MEGF6 et MATN2 (**Tableau 10**). NS5a du BTV-8 a une séquence plus courte que NS5 du BTV-8 correspondant à une forme tronquée des 9 premiers acides aminés. Toutes les interactions étant conservées avec NS5a, la partie N-terminale de NS5 ne serait probablement pas impliquée dans l'établissement des interactions.

1.2.2 Tests d'interaction par GST pull-down

Six des 9 protéines cellulaires sélectionnées pour NS4 ont été testées en interaction avec les protéines NS4 du BTV-8 et BTV-27 par la méthode de GST pull-down : WTAP, AATF, KANSL2, KIF12, PAWR et CCHCR1. Les interacteurs PAWR et CCHCR1 déterminés comme communs aux

deux NS4 par le test binaire Y2H ont aussi été confirmés par GST *pull-down*. Parmi les interacteurs déterminés spécifiques au BTV-8 après le test Y2H, AATF et KIF12 ont montré qu'ils étaient capables d'interagir également avec BTV27-NS4 en GST *pull-down*. Seule l'interaction entre NS4 et WTAP s'est révélée spécifique à la souche BTV-8 par cette approche biochimique. Trois des 5 protéines bovines identifiées ont pu être testées en interaction avec NS5/NS5a du BTV-8 et NS5 du BTV-27 ; hnRNPK, GRN et C1QBP. L'interaction entre C1QBP et les trois variants de NS5 a ainsi été confirmée (**Tableau 10**).

Par la méthode de GST *pull-down*, les interactions NS4/KANSL2, NS5/GRN et NS5/hnRNPK n'ont pas été validées du fait d'une liaison aspécifique des protéines cellulaires avec l'étiquette GST ou les billes de glutathion sépharose. La spécificité d'interaction entre hnRNPK et NS5/NS5a du sérotype 8 du BTV n'a, par conséquent, pas pu être confirmée par cette approche. Afin de palier à ce problème, un GST *pull-down* pourrait être réalisé en inversant les étiquettes fusionnées aux protéines d'intérêt, c'est-à-dire avec les protéines bovines fusionnées à la GST et NS4 ou NS5 à l'étiquette 3xFlag.

Tableau 10 : Bilan comparatif des tests d'interaction réalisés par Y2H et par GST *pull-down*.

nt : non testé / nd : non déterminé

Protéine virale	Protéine cellulaire	Test binaire Y2H		GST <i>pull-down</i>	
		Interaction	Spécificité	Interaction	Spécificité
NS4	WTAP	Oui	BTV-8	Oui	BTV-8
	AATF	Oui	BTV-8	Oui	Commun
	KIF12	Oui	BTV-8	Oui	Commun
	BRD2	Oui	BTV-8		nt
	MAPK7	Oui	BTV-27		nt
	KANSL2	Oui	Commun		nd
	PAWR	Oui	Commun	Oui	Commun
	LUC7L	Oui	Commun		nt
	CCHCR1	Oui	Commun	Oui	Commun
NS5/NS5a	hnRNPK	Oui	BTV-8		nd
	GRN	Oui	Commun		nd
	C1QBP	Oui	Commun	Oui	Commun
	MEGF6	Oui	Commun		nt
	MATN2	Oui	Commun		nt

Les différences observées entre les résultats obtenus en Y2H et par la méthode biochimique peuvent s'expliquer par le fait que ce sont les formes entières des protéines cellulaires qui ont été testées en GST *pull-down*. Ceci suggère que pour établir et maintenir l'interaction entre les deux protéines, la forme native assurant la bonne conformation des protéines est nécessaire. Les méthodes de validation des interactions utilisées dans ce projet se sont révélées complémentaires. Le test binaire en levure a permis de valider rapidement et sans difficulté de clonage les résultats obtenus lors du crible initial. Le GST *pull-down* a permis, d'abord de confirmer les interactions et, ensuite de mieux identifier celles qui sont réellement spécifiques à un sérotype du BTV. La GST faisant 25 kDa, cette approche utilise une étiquette de fusion de taille importante qui pourrait toutefois gêner l'établissement ou la stabilité de certaines interactions. Aussi, le recours à une troisième méthode de test d'interaction est envisagé notamment pour les interactions n'ayant pas été confirmées par l'approche biochimique. L'essai de ligature de proximité (PLA) pourrait être utilisée et présente l'avantage de pouvoir visualiser

au sein même de la cellule le lieu de la colocalisation ainsi que de pouvoir étudier les interactions sans surexpression des protéines d'intérêt. Cependant, la technologie est assez onéreuse et est contrainte par l'utilisation d'anticorps spécifiques qui doivent être d'espèces différentes et permettre la reconnaissance des deux partenaires protéiques par immunofluorescence [101]. Dans l'idée de visualiser une interaction directement dans la cellule et même de pouvoir mettre en lumière d'éventuels phénomènes de relocalisation des partenaires protéiques, l'utilisation de petites molécules fluorescentes bipartites est envisagée. L'étude des interactions par la méthode *Bimolecular fluorescence complementation* (BiFC) est basée sur la reformation d'une molécule fluorescente lorsque ses deux fragments, fusionnés à des protéines d'intérêt, sont réunis par l'interaction entre les deux protéines [102].

De manière globale, moins de spécificités d'interaction liées aux sérotypes du BTV ont été mises en évidence que celle supposées d'après les résultats des cribles. Ceci montre l'intérêt d'étudier les interactions protéine/protéine par différentes méthodes afin d'établir et d'affiner les cartographies d'interaction comparée entre protéines virales.

2. Etude fonctionnelle

2.1 Inhibition de l'expression des interacteurs cellulaires

Afin de déterminer si les interacteurs cellulaires identifiés jouaient un rôle important dans l'infection par BTV, nous avons choisi d'inhiber leur expression et d'évaluer l'impact sur la réplication et la production virale. L'utilisation de siRNA a été choisie car elle présente l'intérêt de pouvoir étudier un nombre important de cibles cellulaires. La synthèse à façon des siRNA pour inhiber l'expression des protéines bovines étudiées et l'utilisation des cellules endothéliales BUcEC nous a permis de travailler dans un modèle proche de l'hôte naturel bovin du BTV. Il est cependant à noter que les couples de siRNA ciblant KIF12, MEGF6 et MATN2 ont été évalués trop peu efficaces. Aussi, le design d'autres siRNA ou l'utilisation d'un mélange plus important de siRNA, voire de la technique de CRISPR/Cas9, sont envisagés afin d'étudier la fonction de ces interacteurs.

2.2 Impact de leur inhibition sur l'infection par BTV-8

Bien que l'inhibition de l'expression de MAPK7, KANSL2 et GRN ait été efficace dans les cellules bovines, les résultats obtenus à l'issue de deux expériences indépendantes ne permettent pas de conclure quant à leur impact sur l'infection par BTV. Des expériences supplémentaires seront à réaliser afin de déterminer si l'inhibition de leur expression a un impact sur l'infection virale. A l'heure actuelle, avec un taux d'inhibition compris entre 65 et 95%, l'impact de six interacteurs de NS4 et deux interacteurs de NS5 sur l'infection par BTV-8 a pu être évalué. La quantité de l'ARN viral correspondant au segment 1, l'expression de VP5 et NS3 et le titre viral ont été les paramètres étudiés pour évaluer la modulation de l'infection virale. Par l'analyse de ces paramètres, aucun effet significatif sur l'infection virale n'a été observé avec l'inhibition des interacteurs de NS4, BRD2, PAWR, LUC7L ni avec l'interacteur de NS5, hnRNPK. L'effet des autres interacteurs cellulaires étudiés est décrit ci-dessous.

2.2.1 Effet des interacteurs cellulaires de NS4 : AATF, CCHCR1 et WTAP

L'étude fonctionnelle par inhibition de leur expression suggère un rôle antiviral de AATF et un rôle proviral de CCHCR1 et WTAP.

- AATF :

L'inhibition de l'expression de la protéine bovine AATF a engendré une augmentation de la quantité d'ARN viral ainsi que l'augmentation de l'expression protéique VP5 et NS3 et du titre viral. Par corrélation, lorsqu'elle est présente dans la cellule infectée par le BTV-8, AATF jouerait un rôle antiviral (**Figure 33**).

Plusieurs fonctions de cette protéine cellulaire ont été décrites. AATF est en premier lieu identifiée comme un facteur de transcription antagoniste de l'apoptose. En effet, elle serait capable d'inhiber directement les fonctions de la protéine pro-apoptotique PAWR et aussi de réguler négativement les gènes pro-apoptotiques et positivement les gènes anti-apoptotiques [103]. Le virus de la FCO est connu pour engendrer l'apoptose des cellules [104]. En s'associant à AATF, NS4 pourrait contrer son action anti-apoptotique, ce qui pourrait expliquer l'effet cytopathique plus important observé par Ratinier et collaborateurs dans des cellules ovines infectées par le BTV-8 sauvage en comparaison du virus n'exprimant pas NS4 [77]. Dans le cas de nos études fonctionnelles, nous pourrions analyser par *western blot* l'activation des caspases, marqueurs de l'activation de la voie d'apoptose en réponse à la surexpression de NS4 ou à l'infection par le BTV sauvage en comparaison avec le virus délété de la NS4. Cela nous permettrait de comprendre, suite à l'infection par BTV-8, comment AATF et NS4 modulent l'apoptose.

Parmi ces autres propriétés, AATF possède une localisation principalement décrite comme nucléolaire et son interaction avec l'ARN polymérase I et la sous unité hRPB11 de l'ARN polymérase II a été mise en évidence. AATF participe ainsi à la maturation des ARN ribosomiaux et à la biogenèse des ribosomes [105,106]. AATF pourrait également jouer un rôle dans l'immunité en interagissant avec la protéine STING (*Stimulator of Interferon Genes*) au niveau de la membrane nucléaire [107]. AATF a été identifiée à la fois comme facteur de restriction à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type I (HIV-1) et comme la cible d'un microARN codé par le virus [108]. L'interaction d'AATF avec NS4 pourrait se localiser dans le compartiment nucléolaire. Des expériences de PLA ou de BiFC pourraient être réalisées afin de déterminer cette localisation d'interaction et d'apporter des pistes quant aux fonctions d'AATF et l'impact de NS4 sur ses fonctions.

- CCHCR1 :

L'inhibition de l'expression de CCHCR1 dans les cellules bovines a eu pour conséquence de diminuer l'expression de VP5 et NS3, mais n'a cependant pas eu d'effet sur la quantité d'ARN viral. Ces résultats suggèrent que lorsque CCHCR1 est présente dans la cellule, elle jouerait un rôle proviral pour le BTV-8 au cours de l'infection (**Figure 33**).

La protéine CCHCR1 est associée dans le cytoplasme aux *processing bodies* (*p-bodies*) qui sont composés d'ARNm réprimés et de protéines de dégradation des ARN dont EDC4 avec qui CCHCR1 interagit [109,110]. Ces granules sont le siège d'une restriction traductionnelle des ARNm [111]. De plus, CCHCR1 est capable d'interagir avec la sous-unité 3 de l'ARN polymérase II (RPB3) et ainsi de la séquestrer au cytoplasme, ce qui a pour conséquence d'inhiber la transcription des ARN médiée par l'ARN polymérase II [112]. Par ailleurs, CCHCR1 a été identifiée comme interagissant avec la protéine virale E2 du papillomavirus humain de type 16 (HPV16). E2 qui est normalement

localisée au noyau et de manière diffuse au cytoplasme, est relocalisée par CCHCR1 sous forme de point dans le cytoplasme. Cette interaction rentre en compétition avec l'interaction établie entre E2 et BRD4 qui confère à la protéine virale des propriétés transcriptionnelles pour le génome viral et pour les gènes cellulaires. Son interaction avec CCHCR1 module donc ses propriétés et pourrait favoriser le risque de développement de cancer suite à l'infection virale [113]. Le fait que NS4 soit capable d'inhiber la transcription cellulaire pourrait s'expliquer par sa capacité à interagir avec CCHCR1. Il est envisageable que par sa localisation nucléaire et nucléolaire, NS4 puisse délocaliser CCHCR1 dans ce compartiment cellulaire où CCHCR1 pourrait alors plus facilement recruter RPB3 pour ensuite l'amener et la séquestrer au cytoplasme. NS4 pourrait ainsi inhiber la transcription cellulaire médiée par l'ARN polymérase II. Il serait donc intéressant de préciser la localisation de CCHCR1 et de NS4 au cours de l'infection ou en surexpression de NS4 pour déterminer un potentiel phénomène de relocalisation de l'un ou de l'autre des partenaires. La localisation de RPB3 pourrait également être étudiée dans des cellules surexprimant ou non la protéine NS4 du BTV.

- WTAP :

L'inhibition de l'expression de WTAP n'a pas entraîné de modification de la quantité d'ARN viral, cependant une diminution du titre viral ainsi qu'une diminution de l'expression de VP5 et de NS3 ont été observées. Aussi, l'expression de WTAP dans les cellules bovines favoriserait l'infection par le BTV-8 (**Figure 33**).

WTAP appartient à un complexe protéique catalysant la m6A méthylation des ARN dans lequel elle interagit notamment avec les méthyltransférases METTL3 et METTL14 [114]. WTAP assure la localisation de ce complexe au niveau des *speckles* nucléaires où sont présents des facteurs d'épissage des ARNm [115]. La m6A méthylation est l'une des modifications les plus abondantes des ARN cellulaires et se traduit par l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone 6 de l'adénosine [116]. Elle joue un rôle important dans les étapes de maturation, d'épissage, d'exportation, de traduction et de dégradation des ARN [117]. C'est une modification dynamique et réversible, elle module l'expression de nombreux gènes impliqués dans beaucoup de processus cellulaires dont la réponse immunitaire innée [118,119]. Cette modification est également retrouvée dans les ARN viraux issus d'un large éventail de virus, à l'ARN comme à l'ADN et peut avoir des rôles opposés dans la réplication de différents virus [117,120]. Par exemple, il a été montré que la m6A méthylation des ARN des virus de l'hépatite B et C donnait un avantage au virus car elle empêcherait leur reconnaissance par RIG-I et MDA5 et par conséquent l'induction de la réponse immunitaire innée [121]. De plus, la m6A méthylation pourrait réguler négativement la réponse à l'interféron de type I en augmentant le taux de renouvellement de l'ARNm codant l'IFN- β [122]. Il a également été montré que le taux d'expression de WTAP pouvait être diminué dans des cellules infectées par le virus Sendai ou encore par le virus de la stomatite vésiculaire. Ceci ayant pour conséquence de diminuer la modification m6A, et donc la traduction, des ARNm codant pour IRF3 et pour la sous-unité 1 du récepteur IFNAR1, ce qui entraîne une inhibition de la réponse antivirale médiée par l'IFN- α/β [123].

NS4 ayant été décrite comme modulant négativement la transcription des gènes de l'immunité innée, et notamment le gène de l'IFN- β , il est imaginable que cette fonction soit médiée par son interaction avec WTAP. Dans notre étude, l'expression de WTAP ne semble pas être diminuée par l'infection à BTV, nous pouvons donc supposer que NS4 inhibe directement la fonction de WTAP en interagissant avec elle. Aussi, en se basant sur les résultats de RNA-seq obtenus par Ratinier et collaborateurs [86], il serait intéressant de regarder les niveaux de méthylation m6A des ARN dont la

transcription est décrite comme modulée suite à l'infection par BTV et pour lesquels il y a une différence entre l'infection par le BTV sauvage et celui délété de sa NS4 [86]. La méthylation des ARN du BTV exprimant ou non NS4 pourrait également être évaluée. Pour cela, il serait possible d'analyser les ARN par une approche de *cross-linking immunoprecipitation sequencing (CLIP-Seq)* utilisant un anticorps dirigé contre la m6A. Le principe de cette méthode consiste à sélectionner les ARN d'intérêt par immunoprécipitation, ici ceux qui sont méthylés et sur lesquels l'anticorps anti-m6A peut se fixer, pour ensuite les séquencer et les identifier par RNA-Seq [124,125]. En complément, l'étude de la phosphorylation des protéines WTAP, METTL3 et METTL14 pourrait également être réalisée. En effet, il a récemment été montré que l'expression de la kinase US3 des alphaherpesvirus provoquait la phosphorylation de plusieurs protéines du complexe de m6A méthyltransférase dont METTL3, METTL14 et WTAP. Cette phosphorylation s'est avérée corrélée à une inhibition de la modification m6A des ARNm [126].

2.2.2 Effet de l'interacteur cellulaire de NS5 : C1QBP

L'inhibition de C1QBP a modulé positivement l'infection virale en augmentant fortement l'expression de VP5 et NS3. C1QBP jouerait ainsi un rôle antiviral lorsqu'elle est exprimée dans la cellule bovine (**Figure 33**).

Cette protéine a une localisation multi-compartimentale et module de nombreux processus cellulaires liés à la réponse inflammatoire et immunitaire, ainsi qu'au cancer [127,128]. C1QBP est considérée comme un facteur de régulation de l'expression des gènes cellulaires. En effet, il a été montré qu'elle est capable de réguler négativement l'épissage des ARN cellulaires en interagissant avec le facteur d'épissage ASF/SF2 aboutissant à sa séquestration [129]. C1QBP a déjà été identifiée comme interacteur de protéines virales. Elle a notamment été décrite pour interagir avec la protéine Cap du circovirus porcin de type 2 (PCV2). Le site d'interaction entre les deux protéines implique le domaine NLS (*nuclear localization signal*) de Cap et ainsi, C1QBP bloque la localisation au noyau de la protéine virale. Dans ce cas, il a été déterminé que la surexpression de C1QBP diminuait la réplication virale en augmentant la réponse inflammatoire, identifiant ainsi C1QBP comme un facteur de restriction viral [130]. C1QBP a également été montrée interagissant avec la protéine V de l'adénovirus. C1QBP peut présenter une localisation au niveau des mitochondries, mais également au noyau, permettant l'importation de protéines dans le noyau. L'adénovirus détournerait cette fonction via sa protéine V pour amener son génome au noyau [131].

La protéine NS5 de BTV ayant été démontrée comme se localisant au noyau et au nucléole, C1QBP pourrait cibler NS5 pour inhiber son transport au noyau. Mais, à l'inverse, comme NS5 est capable d'inhiber la transcription cellulaire *in vitro* et que C1QBP est associée à la régulation de l'expression génique, NS5 pourrait cibler C1QBP et l'amener au noyau pour inhiber la transcription cellulaire au profit de la réplication virale. Pour déterminer si l'interaction NS5/C1QBP inhibe l'action antivirale de C1QBP ou au contraire, si C1QBP utilise NS5 pour inhiber l'infection virale, des expériences complémentaires seront à réaliser. L'étude de l'impact de la surexpression de C1QBP dans les cellules bovines infectées par le BTV pourrait apporter des données complémentaires à notre étude, ainsi que la comparaison avec un virus muté ne pouvant exprimer NS5 ou bien invalidé pour sa liaison à C1QBP.

2.2.3 Bilan de l'étude fonctionnelle

Dans l'ensemble des résultats obtenus, peu d'effet sur la quantité d'ARN viral a été observé suggérant que l'inhibition des protéines cellulaires d'intérêt n'a pas ou peu d'effet sur la réplication du génome viral. Dans cette étude, la quantification a été réalisée à partir des ARN extraits 24 heures après l'infection. Il se pourrait que les protéines cellulaires modulent la réplication virale à des temps plus précoces de l'infection. Aussi, il serait intéressant de quantifier l'ARN viral à différents temps d'une cinétique allant par exemple de 2 à 24 heures post-infection. L'effet de l'inhibition de WTAP, AATF, CCHCR1 et C1QBP est clairement plus visible sur l'expression des protéines virales. Les protéines VP5 et NS3 ont été choisies car elles sont codées par deux segments différents du BTV et constituent un exemple de protéine structurale et non structurale du virus. Nous supposons que leur inhibition conjointe corrèle avec une inhibition globale de l'expression des protéines du BTV (**Figure 33**). L'évaluation des titres viraux reste à réaliser pour la majorité des interacteurs étudiés. Cependant, pour WTAP et AATF nous avons déjà pu mettre en évidence un effet de leur inhibition sur la production virale. Les différences observées par rapport à la condition contrôle ne sont pas très importantes, avec une modulation d'un facteur 2 à 3. Ceci peut s'expliquer par l'inhibition des interacteurs, qui est partielle. En utilisant un système d'inhibition comme du CRISPR/Cas9 ou, au contraire une surexpression des protéines d'intérêt, peut-être que des différences plus importantes seraient observées. D'autre part, NS4 et NS5 ne sont pas essentielles à la réplication virale. On peut dès lors supposer que les interactions qu'elles établissent avec les protéines cellulaires n'ont qu'un impact partiel sur l'infection virale. Ceci a notamment été observé pour la protéine nsP2 du virus Chikungunya où seulement deux de ses partenaires cellulaires sur une vingtaine ont montré un impact sur la production virale lorsqu'ils étaient inhibés par siRNA [132]. Il est aussi possible que l'action conjointe des différents partenaires de NS4 ou de NS5 ait un effet synergique. Une inhibition croisée de ces partenaires pourrait alors permettre de mieux visualiser un effet sur l'infection par le BTV. Nous pouvons relever que AATF est un antagoniste direct de la protéine PAWR et que d'autre part son expression peut être réprimée par un micro ARN, nommé miRNA-221-3p, dont l'expression est modulée par la m6A méthylation de son ARN pré messenger [133]. Cet exemple pourrait révéler un lien entre trois interacteurs directs de NS4.

L'étude fonctionnelle ayant été menée jusque-là de manière systématique pour l'ensemble des interacteurs, nous nous intéresserons par la suite, plus spécifiquement aux protéines cellulaires ayant montré un effet sur l'infection : WTAP/AATF/CCHCR1 et C1QBP. Afin de déterminer si leur impact sur l'infection est lié à leur interaction avec NS4 ou NS5, de nouvelles expériences pourront être faites en étudiant leur effet dans des cellules infectées par le BTV-8 sauvage et par le BTV-8 délété soit de la NS4 soit de la NS5. Les protéines NS4 et NS5 étant décrites comme inhibant la transcription cellulaire, et leurs interacteurs possédant des fonctions liées à l'expression des gènes, il serait intéressant d'évaluer l'impact de ces protéines virales et cellulaires sur la transcription des ARN. La technologie Click-it® pourrait être utilisée à cet effet. Cette technique ne nécessitant ni anticorps ni radioactivité permet de détecter par fluorescence les ARN nouvellement synthétisés au cours du temps dans les cellules. Le principe réside dans l'incorporation d'un nucléoside modifié par l'alcyne appelé 5-éthynyl uridine (EU) dans les ARN naissant. La détection des ARN nouvellement synthétisés se fait grâce à une réaction chimique médiée par la ligature d'un colorant contenant l'azoture, capable de se lier à l'alcyne [134].

Par l'approche des siRNA, nous avons pu mettre en évidence des facteurs cellulaires jouant un probable rôle antiviral ou proviral (**Figure 33**). L'étude de leur fonction au cours de l'infection par le BTV est à poursuivre afin de déterminer les mécanismes associés et le rôle de NS4 et NS5 dans l'effet de ces protéines cellulaires. En effet, les protéines virales pourraient contrecarrer l'action des facteurs de restriction ou au contraire en être la cible.

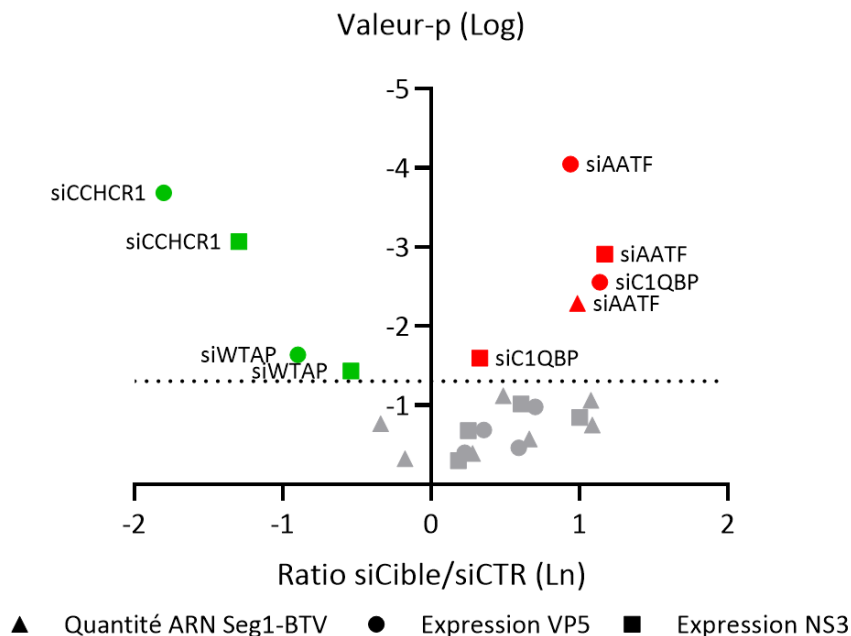


Figure 33 : Bilan de l'impact de l'inhibition d'expression des interacteurs cellulaires sur l'infection BTV.

L'effet de l'inhibition de l'expression de chaque interacteur de NS4 et de NS5 sur la quantité d'ARN viral (triangle) et sur l'expression des protéines virales VP5 (rond) et NS3 (carré) a été représenté sur l'axe des abscisses avec la valeur 0 correspondant à la condition contrôle (siCTR). Les valeurs inférieures à 0 correspondent à une diminution de la répllication ou de l'expression protéique du virus, les valeurs supérieures à 0 à une augmentation.

La significativité statistique de l'effet observé a été représentée en ordonnée avec la valeur-p exprimée ici en logarithme. La valeur seuil de significativité est représentée par la ligne en pointillés. Les valeurs situées en dessous démontrent un résultat non significativement différent de la condition contrôle, et les valeurs situées au-dessus, un résultat significativement différent. L'effet proviral d'un interacteur est représenté avec la couleur verte et un effet antiviral est représenté en rouge. Les paramètres non significativement modulés sont représentés en gris.

3. Caractérisation de l'interaction NS4/WTAP

La protéine bovine WTAP se montrant être un facteur proviral potentiel pour l'infection à BTV-8 et son interaction avec NS4 s'étant révélée spécifique à ce sérotype par rapport au sérotype 27, l'interaction NS4/WTAP a été davantage caractérisée durant ce projet et a fait l'objet d'une publication au journal *Viruses* par notre équipe en janvier 2022 (**Annexe 1**).

3.1 Caractérisation du côté viral

Afin de déterminer le degré de conservation de l'interaction du côté viral, un test par GST *pull-down* a été réalisé entre WTAP bovin et les NS4 des sérotypes classiques BTV-8, -1, -4 et des sérotypes atypiques BTV-27, -25 et -30. La protéine cellulaire a montré une interaction conservée avec les sérotypes classiques BTV-1 et BTV-4 et, plus étonnamment, avec NS4 du sérotype atypique BTV-25. En revanche, tout comme avec NS4 du BTV-27, aucune interaction n'a été mise en évidence avec NS4 du BTV-30. Aussi, aucune spécificité d'interaction associée aux sérotypes classiques du BTV n'est mise en évidence. Par ailleurs, grâce au clonage par *gap-repair* et le test d'interaction en système

levure, nous avons pu rapidement établir un premier fragmentome de NS4 du BTV-8 afin de déterminer des domaines protéiques restreints responsables de l'interaction avec WTAP. Par cette approche, les domaines 1-55 et 22-77 de NS4 du BTV-8 ont été montrés capables d'interagir avec WTAP bovin. La région commune 22-55 semble donc essentielle à l'établissement de l'interaction mais à condition d'être exprimée avec la partie N-terminale ou C-terminale de NS4. L'élaboration de la protéine chimérique BTV27-NS4^{22-55BTV8-NS4} a permis de confirmer le rôle essentiel de ce domaine. Alors que BTV27-NS4 sauvage n'en était pas capable, la chimère BTV27-NS4^{22-55BTV8-NS4} s'est montrée capable d'interagir avec WTAP en test binaire Y2H et par GST *pull-down*.

Il existe une grande conservation de la séquence NS4 chez les sérotypes classiques expliquant la conservation de l'interaction avec WTAP. En revanche la séquence de NS4 du BTV-25 est plus proche de celles des autres sérotypes atypiques. Dans le domaine 22-55 établi comme essentiel pour l'interaction, seul le résidu N35 de NS4 du BTV-25 diffère de la séquence des NS4 du sérotype BTV-27 et -30. Comme NS4 du BTV-25 est capable d'interagir avec WTAP, il serait donc tentant de muter ce résidu dans la séquence de NS4 du BTV-27 et du BTV-30 pour essayer de restaurer l'interaction avec WTAP. Cependant ce résidu est aussi différent chez NS4 des sérotypes classiques. Aussi nous supposons que l'établissement de l'interaction entre NS4 et WTAP dépend davantage de la conformation tridimensionnelle de la protéine virale plutôt que d'un ou quelques résidus en particulier.

3.2 Caractérisation du côté hôte

Pour étudier le degré de conservation du côté de l'hôte, les NS4 du BTV-8 et du BTV-27 ont été testées en interaction avec la forme caprine de WTAP. Cette dernière ne diffère que de 6 résidus par rapport à la forme bovine, partageant ainsi une homologie de séquence de 98,5%. Les résultats de ce test montrent la conservation de l'interaction entre WTAP caprin et NS4 du BTV-8 ainsi que l'absence d'interaction avec NS4 du BTV-27. Ceci suggère une conservation de l'interaction WTAP/NS4 au niveau de l'hôte mammifère du virus. Concernant le domaine minimum de WTAP, l'étude de son fragmentome par Y2H a permis de déterminer son domaine 151-250 comme essentiel à l'interaction avec la NS4 du BTV-8.

Aucune spécificité de l'interaction WTAP/NS4 n'a donc été établie que ce soit du côté hôte comme du côté viral. L'interaction ne serait probablement pas liée à une différence de pathogénicité mais pourrait tout de même être importante pour la répllication virale. Aussi, l'établissement de cette interaction pourrait être corrélée avec une capacité du virus à se répliquer plus facilement ou non dans les cellules de l'hôte mammifère ou du vecteur culicoïde. En outre, le BTV-27 semble incapable de se répliquer dans les cellules KC, contrairement au BTV-25 [7,33]. Il est à noter qu'il existe un homologue de WTAP qui a été identifié chez *C. sonorensis* avec une conservation de séquence d'environ 83% avec la séquence bovine (**Annexe 2**) [135]. Aussi, il serait intéressant d'étudier la capacité des différentes NS4 à interagir avec la forme culicoïde de WTAP.

Comme décrit précédemment, WTAP forme un complexe protéique avec les méthyltransférases 3 et 14. Dans ce complexe, METTL3 catalyse la m6A méthylation et interagit avec METTL14 par sa partie C-terminale pour former un hétérodimère. Son interaction avec WTAP s'établit entre sa partie N-terminale et le domaine 1-150 de WTAP [100]. Les domaines d'interaction de WTAP avec METTL3 et NS4 sont donc différents. Afin de déterminer si l'interaction WTAP/METTL3 est perturbée en présence de NS4 ou si NS4 peut aussi interagir directement avec

METTL3, des analyses par co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-METTL3 dans des cellules bovines surexprimant ou non NS4 du BTV-8 pourraient être réalisées. Une expérience préliminaire de *GST pull-down* avec la surexpression des protéines WTAP bovin et NS4 fusionnée à la GST nous a permis de mettre en évidence une co-purification d'affinité des protéines endogènes METTL3 et METTL14 avec la protéine NS4 (résultats non montrés). Nous supposons que par son interaction avec WTAP, NS4 pourrait interagir avec l'ensemble du complexe de m6A méthylation. L'interaction entre NS4 et WTAP pourrait ainsi moduler l'efficacité du complexe dans la modification des ARN cellulaires.

3.3 Caractérisation de la localisation d'interaction

Par un essai de ligature de proximité (PLA), nous avons mis en évidence que WTAP et NS4 colocalisaient dans le compartiment nucléaire. Le lieu de cette colocalisation ressemble étroitement à celui observé entre WTAP et METTL3. La protéine WTAP étant responsable de la localisation du complexe de m6A méthylation au niveau des *speckles* nucléaires, la présence des points « PLA » situés dans le noyau suggère que NS4 pourrait colocaliser avec WTAP au niveau de ces structures. Un comarquage par immunofluorescence de NS4 avec le facteur d'épissage SC-35 connu pour s'y localiser, couplé à une analyse par microscopie confocale, pourrait ainsi être réalisé [136].

De plus, il serait intéressant de déterminer la dynamique d'interaction entre WTAP et NS4 au cours de l'infection des cellules bovines BUcEC par le BTV-8. En se basant sur les travaux de Ratinier et collaborateurs étudiant l'expression et la localisation de NS4 au cours de l'infection BTV en cellules bovines BFAE [77], la technique de PLA pourrait être employée à différents points d'une cinétique allant de 2 à 24 heures post infection. De la même façon, l'étude de la dynamique du complexe WTAP/METTL3 au cours de l'infection par le BTV-8 sauvage ou en comparaison par le virus délété de sa protéine NS4 pourrait être utile afin de déterminer si les interactions WTAP/NS4 et WTAP/METTL3 rentrent en compétition ou si NS4 pourrait interagir avec l'ensemble du complexe de m6A méthylation. A cet effet, une optimisation de nos conditions de PLA (dilution d'anticorps, confluence des cellules) serait nécessaire pour obtenir des images permettant de quantifier le nombre de points de colocalisation.

4. Importance de la localisation nucléaire et nucléolaire des protéines NS4 et NS5 du BTV

Les protéines NS4 et NS5 du BTV présentent toutes les deux une localisation nucléaire et nucléolaire. Comme décrit précédemment, la localisation nucléolaire est essentielle à NS4 et NS5 dans leur capacité à inhiber la transcription cellulaire. Par ailleurs, les protéines cellulaires ayant été démontrées ici comme interagissant avec elles et modulant l'infection virale, ont été décrites comme des protéines à localisation nucléaire (WTAP) ou nucléolaire (AATF) ou alors capables de relocaliser des protéines virales nucléaires dans d'autres compartiments cellulaires (CCHCR1, C1QBP). De plus, la fonction de ces interacteurs est principalement associée à l'expression des gènes cellulaires.

Comme le BTV, d'autres virus à réplication cytoplasmique codent pour des protéines non structurales capables de se localiser au nucléole [137]. Bien que les mécanismes précis ne soient pas toujours connus, le compartiment nucléolaire est la cible de certains virus pour augmenter leur réplication virale [83]. Ainsi, des protéines virales ont été décrites comme nucléolaires ou circulantes

entre le nucléole et les autres compartiments cellulaires, et au cours de l'infection, elles interagissent avec des facteurs cellulaires. Des protéines cellulaires nucléolaires peuvent ainsi être redistribuées dans d'autres compartiments et à l'inverse, certaines protéines cellulaires peuvent être délocalisées dans le nucléole [138]. Par exemple, le HCV code pour la protéine NS5B qui serait capable d'interagir avec l'un des constituants majeurs des nucléoles, la nucléoline. Cette interaction engendre la relocalisation de la nucléoline dans le cytoplasme, ce qui favoriserait la réplication du virus [139]. La protéine nsP2 codée par l'alphavirus de la forêt Semliki (*Semliki Forest Virus*, SFV) est décrite comme un facteur de virulence multifonctionnel. Sa localisation nucléaire et nucléolaire serait responsable en partie de l'effet cytopathique engendré par l'infection virale [140]. NSs de l'orthobunyavirus Schmallenberg (SBV) est un autre exemple d'une protéine virale nucléolaire capable d'inhiber la transcription cellulaire. Sa localisation nucléolaire est essentielle à cette fonction. NSs induit la désorganisation du nucléole qui précède la dégradation de la sous-unité RPB1 de l'ARN polymérase II entraînant l'inhibition de la transcription cellulaire [141,142]. Ces protéines ne sont pas forcément essentielles pour la réplication virale, cependant elles donnent un avantage au virus pour sa réplication et peuvent moduler sa pathogénèse. Ceci souligne l'importance d'étudier ces protéines virales nucléaires ou nucléolaires afin de mieux comprendre leur implication dans l'infection virale et les mécanismes cellulaires associés.

5. Conclusion générale

La stratégie que nous avons employée pour étudier les interactions impliquant les protéines NS4 et NS5 du BTV nous a permis d'identifier neuf protéines cellulaires bovines interagissant avec NS4 et cinq avec NS5. Parmi ces interacteurs cellulaires, nous avons pu identifier WTAP et CCHCR1 comme probable facteur de dépendance et, AATF et C1QBP comme probable facteur de restriction du virus de la FCO (**Figure 34**). Bien que les mécanismes d'action liés à ces interactions restent à élucider, notre travail apporte des pistes de compréhension des fonctions de NS4 et NS5 mais aussi de la réponse cellulaire à l'infection par le BTV. Seules les interactions WTAP/NS4 et hnRNPk/NS5 ont montré une différence entre les protéines des sérotypes 8 et 27 du BTV. Ces résultats ne nous permettent pas à ce jour d'expliquer la différence phénotypique observée après l'infection par le BTV-8 et le BTV-27. Cependant ils laissent à penser que les protéines non structurales du BTV-8 sont capables d'établir davantage d'interactions, ce qui pourrait refléter une plus grande adaptation de ce sérotype pour infecter un plus large panel d'hôtes mammifères et arthropodes.

Dans la continuité du travail déjà réalisé, nous viserons à mieux caractériser les interactions entre NS4 et les protéines bovines AATF et CCHCR1 ainsi qu'entre NS5 et C1QBP. Nous chercherons également à comprendre quels sont les mécanismes cellulaires associés à ces interactions. Par la suite, la même stratégie d'étude des interactions protéine/protéine sera suivie pour les autres protéines non structurales du BTV, mais aussi pour les interactions établies avec les protéines du vecteur culicoïde. Dans un cadre plus large, cette stratégie sera appliquée à d'autres orbivirus ayant un impact important en santé animale, les virus AHSV et EHDV.

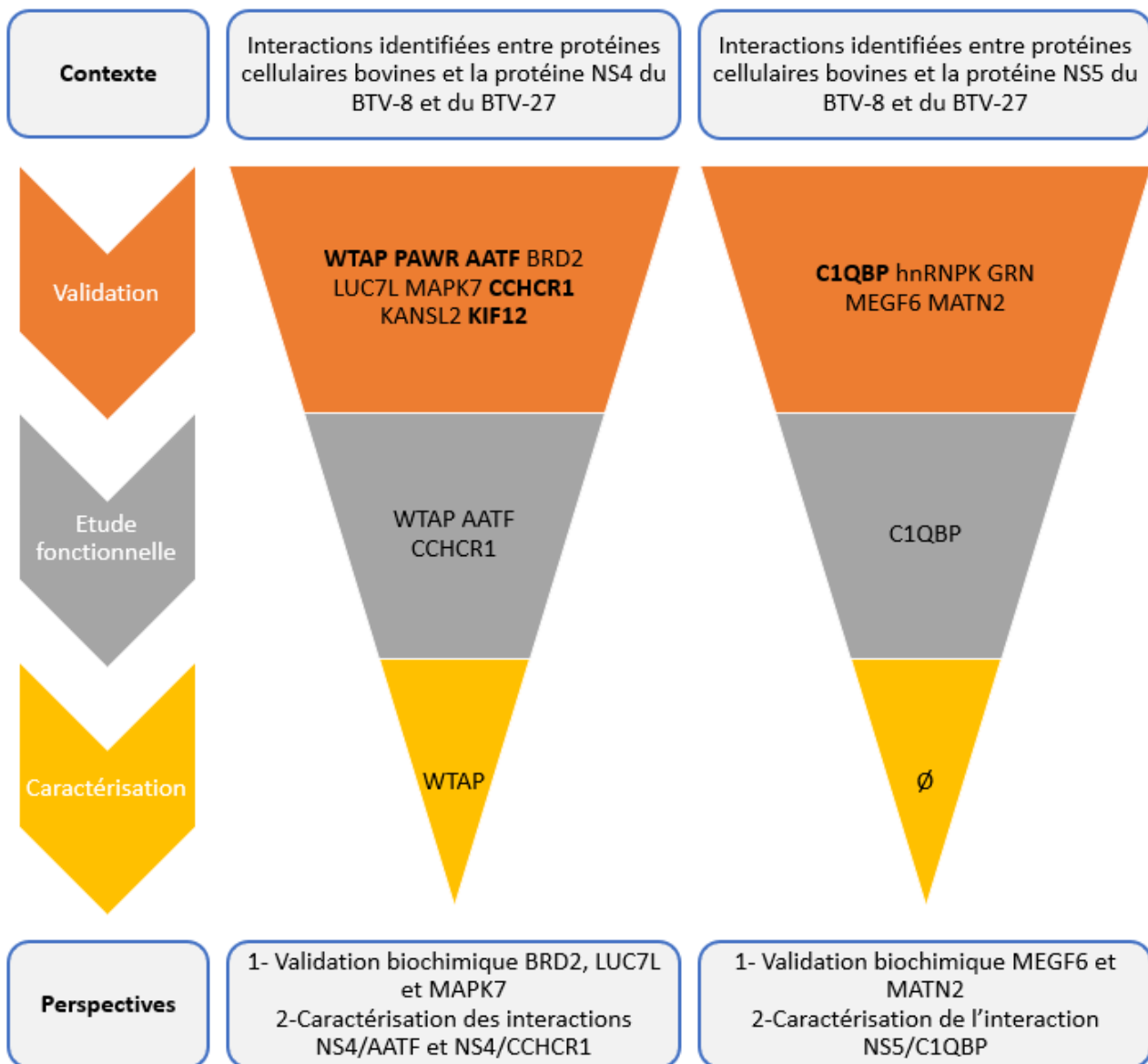


Figure 34 : Schéma représentant le bilan de l'étude des interactions de NS4 et NS5 du BTV.

Validation : sont notés les protéines cellulaires pour lesquelles l'interaction avec la protéine virale a été confirmée. Les interacteurs en gras ont été confirmés par les deux méthodes utilisées.

Etude fonctionnelle : sont notés les interacteurs dont l'inhibition a impacté l'infection par le BTV.

Caractérisation : WTAP est la protéine pour laquelle l'étude de son interaction avec NS4 a été la plus complète.

Bibliographie

1. Gourreau JM, Balenghien T, Belbis G, Berkvens D, Boireau P, Calavas D, et al. La fièvre catarrhale ovine : histoire, signes cliniques, prévention. Guides France Agricole. Groupe France Agricole; 2009. 185 p.
2. Wilson A, Darpel K, Mellor PS. Where Does Bluetongue Virus Sleep in the Winter? PLoS Biol. 26 août 2008;6(8):e210.
3. Saegerman C, Reviriego-Gordejo F, Pastoret PP. Fièvre catarrhale ovine: en Europe du Nord [Internet]. Paris: OIE; 2008. Disponible sur: <https://studylibfr.com/doc/954749/fi%C3%A8vre-catarrhale-ovine>
4. Ropiak HM, King S, Busquets MG, Newbrook K, Pullinger GD, Brown H, et al. Identification of a BTV-Strain-Specific Single Gene That Increases Culicoides Vector Infection Rate. Viruses. 7 sept 2021;13(9):1781.
5. Pullinger GD, Guimera Busquets M, Nomikou K, Boyce M, Attoui H, Mertens PP. 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. 18 févr 2016;11(2):e0149709.
6. Magliano A, Scaramozzino P, Ravagnan S, Montarsi F, DA Rold G, Cincinelli G, et al. Indoor and outdoor winter activity of Culicoides biting midges, vectors of bluetongue virus, in Italy. Med Vet Entomol. mars 2018;32(1):70-7.
7. Bréard E, Schulz C, Sailleau C, Bernelin-Cottet C, Viarouge C, Vitour D, et al. Bluetongue virus serotype 27: Experimental infection of goats, sheep and cattle with three BTV-27 variants reveal atypical characteristics and likely direct contact transmission BTV-27 between goats. Transbound Emerg Dis. avr 2018;65(2):e251-63.
8. Batten C, Darpel K, Henstock M, Fay P, Veronesi E, Gubbins S, et al. Evidence for Transmission of Bluetongue Virus Serotype 26 through Direct Contact. PLoS ONE. 5 mai 2014;9(5):e96049.
9. Bumbarov V, Golender N, Jenckel M, Wernike K, Beer M, Khinich E, et al. Characterization of bluetongue virus serotype 28. Transbound Emerg Dis. janv 2020;67(1):171-82.
10. Wilson AJ, Mellor PS. Bluetongue in Europe: past, present and future. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 27 sept 2009;364(1530):2669-81.
11. Niedbalski W. Bluetongue in Europe and the role of wildlife in the epidemiology of disease. Pol J Vet Sci. 2015;18(2):455-61.
12. Schwartz-Cornil I, Mertens PPC, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, et al. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. Vet Res. sept 2008;39(5):46.
13. Zanella G, Durand B, Sellal E, Breard E, Sailleau C, Zientara S, et al. Bluetongue virus serotype 8: Abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008–2009. Theriogenology. janv 2012;77(1):65-72.
14. Belbis G, Zientara S, Bréard E, Sailleau C, Caignard G, Vitour D, et al. Bluetongue Virus: From BTV-1 to BTV-27. Adv Virus Res. 2017;99:161-97.
15. Kundlacz C, Caignard G, Sailleau C, Viarouge C, Postic L, Vitour D, et al. Bluetongue Virus in France: An Illustration of the European and Mediterranean Context since the 2000s. Viruses. 23 juill 2019;11(7):672.
16. Savini G, Potgieter AC, Monaco F, Mangana-Vougiouka O, Nomikou K, Yadin H, et al. VP2 gene sequence analysis of some isolates of bluetongue virus recovered in the Mediterranean Basin during the 1998-2002 outbreak. Vet Ital. 2004;6.
17. Carpenter S, McArthur C, Selby R, Ward R, Nolan DV, Luntz AJM, et al. Experimental infection studies of UK Culicoides species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. Vet Rec. 15 nov 2008;163(20):589-92.

18. Mintiens K, Méroc E, Mellor PS, Staubach C, Gerbier G, Elbers ARW, et al. Possible routes of introduction of bluetongue virus serotype 8 into the epicentre of the 2006 epidemic in north-western Europe. *Prev Vet Med.* oct 2008;87(1-2):131-44.
19. Maan S, Maan NS, Ross-smith N, Batten CA, Shaw AE, Anthony SJ, et al. Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. *Virology.* août 2008;377(2):308-18.
20. Elbers ARW, Backx A, Meroc E, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, et al. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. *Prev Vet Med.* oct 2008;87(1-2):21-30.
21. Nomikou K, Hughes J, Wash R, Kellam P, Breard E, Zientara S, et al. Widespread Reassortment Shapes the Evolution and Epidemiology of Bluetongue Virus following European Invasion. Tiao G, éditeur. *PLOS Pathog.* 7 août 2015;11(8):e1005056.
22. Lorusso A, Sghaier S, Carvelli A, Di Gennaro A, Leone A, Marini V, et al. Bluetongue virus serotypes 1 and 4 in Sardinia during autumn 2012: New incursions or re-infection with old strains? *Infect Genet Evol.* 1 oct 2013;19:81-7.
23. Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Vitour D, Romey A, Garnier A, et al. Re-Emergence of Bluetongue Virus Serotype 8 in France, 2015. *Transbound Emerg Dis.* juin 2017;64(3):998-1000.
24. Flannery J, Sanz-Bernardo B, Ashby M, Brown H, Carpenter S, Cooke L, et al. Evidence of reduced viremia, pathogenicity and vector competence in a re-emerging European strain of bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Transbound Emerg Dis.* mai 2019;66(3):1177-85.
25. Pascall DJ, Nomikou K, Bréard E, Zientara S, Filipe A da S, Hoffmann B, et al. “Frozen evolution” of an RNA virus suggests accidental release as a potential cause of arbovirus re-emergence. Read AF, éditeur. *PLOS Biol.* 28 avr 2020;18(4):e3000673.
26. Turpaud M, Bréard E, Sailleau C, Zientara S. Émergence du virus de la fièvre catarrhale ovine (stéréotype 4) en France métropolitaine en 2017. *Bull Académie Vét Fr.* 2018;(1):24.
27. Maan S, Maan NS, Samuel AR, Rao S, Attoui H, Mertens PPC. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *J Gen Virol.* 1 févr 2007;88(2):621-30.
28. Ries C, Sharav T, Tseren-Ochir EO, Beer M, Hoffmann B. Putative Novel Serotypes ‘33’ and ‘35’ in Clinically Healthy Small Ruminants in Mongolia Expand the Group of Atypical BTV. *Viruses.* 29 déc 2020;13(1):42.
29. Ries C, Vöggtlin A, Hüßy D, Jandt T, Gobet H, Hilbe M, et al. Putative Novel Atypical BTV Serotype « 36 » Identified in Small Ruminants in Switzerland. *Viruses.* 21 avr 2021;13(5):721.
30. Maan S, Maan NS, Nomikou K, Veronesi E, Bachanek-Bankowska K, Belaganahalli MN, et al. Complete Genome Characterisation of a Novel 26th Bluetongue Virus Serotype from Kuwait. Beer M, éditeur. *PLoS ONE.* 21 oct 2011;6(10):e26147.
31. Sun EC, Huang LP, Xu QY, Wang HX, Xue XM, Lu P, et al. Emergence of a Novel Bluetongue Virus Serotype, China 2014. *Transbound Emerg Dis.* déc 2016;63(6):585-9.
32. Lorusso A, Sghaier S, Di Domenico M, Barbria ME, Zaccaria G, Megdich A, et al. Analysis of bluetongue serotype 3 spread in Tunisia and discovery of a novel strain related to the bluetongue virus isolated from a commercial sheep pox vaccine. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* avr 2018;59:63-71.
33. Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, Chaignat V, Worwa G, Thuer B. Genetic Characterization of Toggenburg Orbivirus, a New Bluetongue Virus, from Goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(12):7.
34. Marcacci M, Sant S, Mangone I, Gorla M, Dondo A, Zoppi S, et al. One after the other: A novel Bluetongue virus strain related to Toggenburg virus detected in the Piedmont region (North-western Italy), extends the panel of novel atypical BTV strains. *Transbound Emerg Dis.* avr 2018;65(2):370-4.

35. Ries C, Domes U, Janowetz B, Böttcher J, Burkhardt K, Miller T, et al. Isolation and Cultivation of a New Isolate of BTV-25 and Presumptive Evidence for a Potential Persistent Infection in Healthy Goats. *Viruses*. 4 sept 2020;12(9):983.
36. Maan S, Maan NS, Nomikou K, Batten C, Antony F, Belaganahalli MN, et al. Novel Bluetongue Virus Serotype from Kuwait. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):4.
37. Zientara S, Sailleau C, Viarouge C, Höper D, Beer M, Jenckel M, et al. Novel Bluetongue Virus in Goats, Corsica, France, 2014. *Emerg Infect Dis*. déc 2014;20(12):2123-32.
38. Schulz C, Bréard E, Sailleau C, Jenckel M, Viarouge C, Vitour D, et al. Bluetongue virus serotype 27: detection and characterization of two novel variants in Corsica, France. *J Gen Virol*. 1 sept 2016;97(9):2073-83.
39. Yang H, Gu W, Li Z, Zhang L, Liao D, Song J, et al. Novel Putative Bluetongue Virus Serotype 29 Isolated from Inapparently Infected Goat in Xinjiang of China. *Transbound Emerg Dis*. 15 nov 2020;tbed.13927.
40. Savini G, Puggioni G, Meloni G, Marcacci M, Di Domenico M, Rocchigiani AM, et al. Novel putative Bluetongue virus in healthy goats from Sardinia, Italy. *Infect Genet Evol*. juill 2017;51:108-17.
41. Ries C, Beer M, Hoffmann B. Bluetongue Virus Infection of Goats: Re-Emerged European Serotype 8 vs. Two Atypical Serotypes. *Viruses*. 13 mai 2022;14(5):1034.
42. Bluetongue | Food Safety [Internet]. [cité 1 avr 2020]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/control-measures/bluetongue_en
43. Villard P. Évaluation de l'impact et de l'efficacité de la surveillance et de la lutte de la fièvre catarrhale ovine en France. :160.
44. van Rijn PA. Prospects of Next-Generation Vaccines for Bluetongue. *Front Vet Sci*. 21 nov 2019;6:407.
45. van Rijn PA, Maris-Veldhuis MA, van Gennip RGP. The Bluetongue Disabled Infectious Single Animal (DISA) Vaccine Platform Based on Deletion NS3/NS3a Protein Is Safe and Protective in Cattle and Enables DIVA. *Viruses*. mai 2021;13(5):857.
46. Taxonomy [Internet]. [cité 5 juin 2022]. Disponible sur: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
47. Mertens PPC, Diprose J, Maan S, Singh KP, Attoui H, Samuel AR. Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. *Vet Ital*. 2004;12.
48. Mertens PPC, Brown F, Sangar DV. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology*. 1 mai 1984;135(1):207-17.
49. Roy P. Bluetongue virus structure and assembly. *Curr Opin Virol*. 1 juin 2017;24:115-23.
50. Patel A, Roy P. The molecular biology of Bluetongue virus replication. *Virus Res*. 1 mars 2014;182:5-20.
51. Boyce M, Celma CCP, Roy P. Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis. *Virol J*. 2012;9(1):178.
52. Modrof J, Lympelopoulos K, Roy P. Phosphorylation of Bluetongue Virus Nonstructural Protein 2 Is Essential for Formation of Viral Inclusion Bodies. *J Virol*. 1 août 2005;79(15):10023-31.
53. Lympelopoulos K, Noad R, Tosi S, Nethisinghe S, Brierley I, Roy P. Specific binding of Bluetongue virus NS2 to different viral plus-strand RNAs. *Virology*. sept 2006;353(1):17-26.
54. Celma CCP, Roy P. A viral nonstructural protein regulates bluetongue virus trafficking and release. *J Virol*. juill 2009;83(13):6806-16.
55. Kerviel A, Ge P, Lai M, Jih J, Boyce M, Zhang X, et al. Atomic structure of the translation regulatory protein NS1 of bluetongue virus. *Nat Microbiol*. mai 2019;4(5):837-45.
56. Owens RJ, Limn C, Roy P. Role of an Arbovirus Nonstructural Protein in Cellular Pathogenesis and Virus Release. *J Virol*. juin 2004;78(12):6649-56.
57. Fillmore GC, Lin H, Li JKK. Localization of the Single-Stranded RNA-Binding Domains of Bluetongue Virus Nonstructural Protein NS2. *J Virol*. janv 2002;76(2):499-506.

58. Mumtsidu E, Makhov AM, Roessle M, Bathke A, Tucker PA. Structural features of the Bluetongue virus NS2 protein. *J Struct Biol.* nov 2007;160(2):157-67.
59. van Gennip RGP, van de Water SGP, van Rijn PA. Bluetongue Virus Nonstructural Protein NS3/NS3a Is Not Essential for Virus Replication. Attoui H, éditeur. *PLoS ONE.* 20 janv 2014;9(1):e85788.
60. Bansal OB, Stokes A, Bansal A, Bishop D, Roy P. Membrane Organization of Bluetongue Virus Nonstructural Glycoprotein NS3. *J Virol.* avr 1998;72(4):3362-9.
61. Freed EO. Viral Late Domains. *J Virol.* mai 2002;76(10):4679-87.
62. Ftaich N, Ciancia C, Viarouge C, Barry G, Ratinier M, van Rijn PA, et al. Turnover Rate of NS3 Proteins Modulates Bluetongue Virus Replication Kinetics in a Host-Specific Manner. López S, éditeur. *J Virol.* 15 oct 2015;89(20):10467-81.
63. Boujard D, Anselme B, Cullin C, Raguénès-Nicol C. *Biologie cellulaire et moléculaire.* 3eme éd. Dunod; 2019. (Tout en fiches).
64. Vitour D, Doceul V, Ruscanu S, Chauveau E, Schwartz-Cornil I, Zientara S. Induction and control of the type I interferon pathway by Bluetongue virus. *Virus Res.* mars 2014;182:59-70.
65. Chauveau E, Doceul V, Lara E, Breard E, Sailleau C, Vidalain PO, et al. NS3 of Bluetongue Virus Interferes with the Induction of Type I Interferon. *J Virol.* 15 juill 2013;87(14):8241-6.
66. Pourcelot M, Zemirli N, Silva Da Costa L, Loyant R, Garcin D, Vitour D, et al. The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing. *BMC Biol.* 18 août 2016;14:69.
67. Saïb A, Agut H, Barin F, Basmaciogullari S, Cosset FL, Dimitrova M, et al. *Panorama de la virologie.* Belin; 2013.
68. Doceul V, Chauveau E, Lara E, Bréard E, Sailleau C, Zientara S, et al. Dual Modulation of Type I Interferon Response by Bluetongue Virus. *J Virol.* sept 2014;88(18):10792-802.
69. Li Z, Lu D, Yang H, Li Z, Zhu P, Xie J, et al. Bluetongue virus non-structural protein 3 (NS3) and NS4 coordinatively antagonize type I interferon signaling by targeting STAT1. *Vet Microbiol.* 1 mars 2021;254:108986.
70. Avia M, Rojas JM, Miorin L, Pascual E, Van Rijn PA, Martín V, et al. Virus-induced autophagic degradation of STAT2 as a mechanism for interferon signaling blockade. *EMBO Rep.* 5 nov 2019;20(11):e48766.
71. Kundlacz C, Pourcelot M, Fablet A, Viarouge C, Sailleau C, Turpaud M, et al. Novel Function of Bluetongue Virus NS3 Protein in Regulation of the MAPK/ERK Signaling Pathway. *J Virol.* 2019;93(16):17.
72. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia.* 1 févr 2004;18(2):189-218.
73. Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, et al. Differential regulation of I κ B kinase α and β by two upstream kinases, NF- κ B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci.* 31 mars 1998;95(7):3537-42.
74. Firth AE. Bioinformatic analysis suggests that the Orbivirus VP6 cistron encodes an overlapping gene. *Virol J.* 14 avr 2008;5:48.
75. Belhouchet M, Mohd Jaafar F, Firth AE, Grimes JM, Mertens PPC, Attoui H. Detection of a Fourth Orbivirus Non-Structural Protein. Tetteh KKA, éditeur. *PLoS ONE.* 12 oct 2011;6(10):e25697.
76. Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* 8 juill 1999;234(2):187-208.
77. Ratinier M, Caporale M, Golder M, Franzoni G, Allan K, Nunes SF, et al. Identification and Characterization of a Novel Non-Structural Protein of Bluetongue Virus. Heise M, éditeur. *PLoS Pathog.* 29 déc 2011;7(12):e1002477.
78. Hernandez-Verdun D, Louvet É. *Le nucléole : structure, fonctions et maladies associées.* médecine/sciences. janv 2004;20(1):37-44.

79. Pederson T. The Nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 mars 2011;3(3):a000638-a000638.
80. Boughan S, Potgieter AC, van Staden V. African horse sickness virus NS4 is a nucleocytoplasmic protein that localizes to PML nuclear bodies. *J Gen Virol.* avr 2020;101(4):366-84.
81. Chang HR, Munkhjargal A, Kim MJ, Park SY, Jung E, Ryu JH, et al. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutat Res.* mai 2018;809:99-107.
82. Scherer M, Stamminger T. Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *J Virol.* 10 juin 2016;90(13):5850-4.
83. Greco A. Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Rev Med Virol.* 2009;19(4):201-14.
84. Zwart L, Potgieter CA, Clift SJ, van Staden V. Characterising Non-Structural Protein NS4 of African Horse Sickness Virus. *PloS One.* 2015;10(4):e0124281.
85. Varela M, Schnettler E, Caporale M, Murgia C, Barry G, McFarlane M, et al. Schmallenberg Virus Pathogenesis, Tropism and Interaction with the Innate Immune System of the Host. Weber F, éditeur. *PLoS Pathog.* 10 janv 2013;9(1):e1003133.
86. Ratnien M, Shaw AE, Barry G, Gu Q, Di Gialleonardo L, Janowicz A, et al. Bluetongue Virus NS4 Protein Is an Interferon Antagonist and a Determinant of Virus Virulence. López S, éditeur. *J Virol.* 1 juin 2016;90(11):5427-39.
87. Wall GV, Wright IM, Barnardo C, Erasmus BJ, van Staden V, Potgieter AC. African horse sickness virus NS4 protein is an important virulence factor and interferes with JAK-STAT signaling during viral infection. *Virus Res.* juin 2021;298:198407.
88. Stewart M, Hardy A, Barry G, Pinto RM, Caporale M, Melzi E, et al. Characterization of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus. *J Gen Virol.* 1 nov 2015;96(11):3280-93.
89. Biswas SK, Mondal B, Chand K, Nautiyal S, Subramaniam S, Singh KP, et al. Genetic and phylogenetic characterization of polycistronic dsRNA segment-10 of bluetongue virus isolates from India between 1985 and 2011. *Virus Genes.* août 2021;57(4):369-79.
90. Dyer MD, Murali TM, Sobral BW. The Landscape of Human Proteins Interacting with Viruses and Other Pathogens. *PLoS Pathog.* févr 2008;4(2):e32.
91. de Chasse B, Meyniel-Schicklin L, Vonderscher J, André P, Lotteau V. Virus-host interactomics: new insights and opportunities for antiviral drug discovery. *Genome Med.* 29 nov 2014;6(11):115.
92. Kundlacz C. 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 [Internet] [These de doctorat]. Paris Est; 2018 [cité 10 juill 2022]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2018PESC1097>
93. UniProt [Internet]. [cité 25 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.uniprot.org/>
94. Lagrée AC, Fasani F, Rouxel C, Pivet M, Pourcelot M, Fablet A, et al. Bovine Organospecific Microvascular Endothelial Cell Lines as New and Relevant In Vitro Models to Study Viral Infections. *Int J Mol Sci.* 24 juill 2020;21(15):5249.
95. Le Gal MC, Dufour B, Geoffroy E, Zanella G, Moutou F, Millemann Y, et al. Bluetongue virus serotype 8 in the Ardennes in 2007. *Vet Rec.* 29 nov 2008;163(22):668.
96. Sailleau C, Breard E, Viarouge C, Gorlier A, Quenault H, Hirchaud E, et al. Complete genome sequence of bluetongue virus serotype 4 that emerged on the French island of Corsica in December 2016. *Transbound Emerg Dis.* févr 2018;65(1):e194-7.
97. van Gennip RGP, van de Water SGP, Potgieter CA, Wright IM, Veldman D, van Rijn PA. Rescue of recent virulent and avirulent field strains of bluetongue virus by reverse genetics. *PloS One.* 2012;7(2):e30540.

98. Vidalain PO, Jacob Y, Hagemeijer MC, Jones LM, Neveu G, Roussarie JP, et al. A Field-Proven Yeast Two-Hybrid Protocol Used to Identify Coronavirus–Host Protein–Protein Interactions. *Coronaviruses*. 18 déc 2014;1282:213-29.
99. Lei C, Yang J, Hu J, Sun X. On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity. *Virologica Sinica*. 26 mai 2020;36(1):141-4.
100. Schöller E, Weichmann F, Treiber T, Ringle S, Treiber N, Flatley A, et al. Interactions, localization, and phosphorylation of the m⁶A generating METTL3–METTL14–WTAP complex. *RNA*. avr 2018;24(4):499-512.
101. Alam MS. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol*. nov 2018;123(1):e58.
102. Kerppola TK. Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods Cell Biol*. 2008;85:431-70.
103. Srinivas AN, Suresh D, Mirshahi F, Santhekadur PK, Sanyal AJ, Kumar DP. Emerging roles of AATF: Checkpoint signaling and beyond. *J Cell Physiol*. 2021;236(5):3383-95.
104. Mortola E, Larsen A. Bluetongue virus infection: activation of the MAP kinase-dependent pathway is required for apoptosis. *Res Vet Sci*. déc 2010;89(3):460-4.
105. Sorino C, Catena V, Bruno T, De Nicola F, Scalera S, Bossi G, et al. Che-1/AATF binds to RNA polymerase I machinery and sustains ribosomal RNA gene transcription. *Nucleic Acids Res*. 19 juin 2020;48(11):5891-906.
106. Piñeiro D, Stoneley M, Ramakrishna M, Alexandrova J, Dezi V, Juke-Jones R, et al. Identification of the RNA polymerase I-RNA interactome. *Nucleic Acids Res*. 16 nov 2018;46(20):11002-13.
107. Dixon CR, Malik P, de las Heras JI, Saiz-Ros N, de Lima Alves F, Tingey M, et al. STING nuclear partners contribute to innate immune signaling responses. *iScience*. 2021;24(9).
108. Kaul D. Cellular AATF gene: armour against HIV-1. *Indian J Biochem Biophys*. oct 2007;44(5):276-8.
109. Ling YH, Wong CC, Li KW, Chan KM, Boukamp P, Liu WK. CCHCR1 interacts with EDC4, suggesting its localization in P-bodies. *Exp Cell Res*. sept 2014;327(1):12-23.
110. Luo Y, Na Z, Slavoff SA. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*. 1 mai 2018;57(17):2424-31.
111. Hubstenberger A, Courel M, Bénard M, Souquere S, Ernout-Lange M, Chouaib R, et al. P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Mol Cell*. oct 2017;68(1):144-157.e5.
112. Corbi N, Bruno T, De Angelis R, Di Padova M, Libri V, Di Certo MG, et al. RNA polymerase II subunit 3 is retained in the cytoplasm by its interaction with HCR, the psoriasis vulgaris candidate gene product. *J Cell Sci*. 15 sept 2005;118(Pt 18):4253-60.
113. Muller M, Demeret C. CCHCR1 Interacts Specifically with the E2 Protein of Human Papillomavirus Type 16 on a Surface Overlapping BRD4 Binding. *Banks L, éditeur. PLoS ONE*. 24 mars 2014;9(3):e92581.
114. Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*. févr 2014;24(2):177-89.
115. Galganski L, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res*. 13 oct 2017;45(18):10350-68.
116. Tong J, Flavell RA, Li HB. RNA m⁶A modification and its function in diseases. *Front Med*. août 2018;12(4):481-9.
117. Zhu ZM, Huo FC, Pei DS. Function and evolution of RNA N⁶-methyladenosine modification. *Int J Biol Sci*. 2020;16(11):1929-40.
118. Jiang X, Liu B, Nie Z, Duan L, Xiong Q, Jin Z, et al. The role of m⁶A modification in the biological functions and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 21 févr 2021;6(1):74.
119. McFadden MJ, Horner SM. N⁶-methyladenosine Regulates Host Responses to Viral Infection. *Trends Biochem Sci*. mai 2021;46(5):366-77.

120. Baquero-Perez B, Geers D, Díez J. From A to m6A: The Emerging Viral Epitranscriptome. *Viruses*. 1 juin 2021;13(6):1049.
121. Kim GW, Imam H, Khan M, Siddiqui A. N6-Methyladenosine modification of hepatitis B and C viral RNAs attenuates host innate immunity via RIG-I signaling. *J Biol Chem*. 11 sept 2020;295(37):13123-33.
122. Winkler R, Gillis E, Lasman L, Safra M, Geula S, Soyris C, et al. m6A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons. *Nat Immunol*. févr 2019;20(2):173-82.
123. Ge Y, Ling T, Wang Y, Jia X, Xie X, Chen R, et al. Degradation of WTAP blocks antiviral responses by reducing the m6A levels of IRF3 and IFNAR1 mRNA. *EMBO Rep*. 4 nov 2021;22(11):e52101.
124. Qiu W, Zhang Q, Zhang R, Lu Y, Wang X, Tian H, et al. N6-methyladenosine RNA modification suppresses antiviral innate sensing pathways via reshaping double-stranded RNA. *Nat Commun*. 11 mars 2021;12(1):1582.
125. Lee FCY, Ule J. Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions. *Mol Cell*. 1 févr 2018;69(3):354-69.
126. Jansens RJJ, Verhamme R, Mirza AH, Orlarerin-George A, Van Waesberghe C, Jaffrey SR, et al. Alphaherpesvirus US3 protein-mediated inhibition of the m6A mRNA methyltransferase complex. *Cell Rep*. 19 juill 2022;40(3):111107.
127. McGee AM, Douglas DL, Liang Y, Hyder SM, Baines CP. The mitochondrial protein C1qbp promotes cell proliferation, migration and resistance to cell death. *Cell Cycle Georget Tex*. 1 déc 2011;10(23):4119-27.
128. Li Y, Wei Y, Hao W, Zhao W, Zhou Y, Wang D, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection promotes C1QBP secretion to enhance inflammatory responses. *Vet Microbiol*. 1 févr 2020;241:108563.
129. Petersen-Mahrt SK, Estmer C, Ohrmalm C, Matthews DA, Russell WC, Akusjärvi G. The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EMBO J*. 15 févr 1999;18(4):1014-24.
130. Ma X, Lv C, Wang Q, Li C, Wang P, Luo C, et al. C1QBP inhibits proliferation of porcine circovirus type 2 by restricting nuclear import of the capsid protein. *Arch Virol*. mars 2021;166(3):767-78.
131. Matthews DA, Russell WC. Adenovirus core protein V interacts with p32--a protein which is associated with both the mitochondria and the nucleus. *J Gen Virol*. juill 1998;79 (Pt 7):1677-85.
132. Bouraï M, Lucas-Hourani M, Gad HH, Drosten C, Jacob Y, Tafforeau L, et al. Mapping of Chikungunya Virus Interactions with Host Proteins Identified nsP2 as a Highly Connected Viral Component. *J Virol*. mars 2012;86(6):3121-34.
133. Pan X, Hong X, Li S, Meng P, Xiao F. METTL3 promotes adriamycin resistance in MCF-7 breast cancer cells by accelerating pri-microRNA-221-3p maturation in a m6A-dependent manner. *Exp Mol Med*. janv 2021;53(1):91-102.
134. Holstein JM, Rentmeister A. Current covalent modification methods for detecting RNA in fixed and living cells. *Methods San Diego Calif*. 1 avr 2016;98:18-25.
135. UniProt [Internet]. [cité 26 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A336K8F6/entry>
136. Hall LL, Smith KP, Byron M, Lawrence JB. Molecular anatomy of a speckle. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. juill 2006;288(7):664-75.
137. Hiscox JA, Whitehouse A, Matthews DA. Nucleolar proteomics and viral infection. *PROTEOMICS*. 2010;10(22):4077-86.
138. Salvetti A, Greco A. Viruses and the nucleolus: The fatal attraction. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. juin 2014;1842(6):840-7.

139. Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, et al. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol.* avr 2006;80(7):3332-40.
140. Tamm K, Merits A, Sarand I. Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus. *J Gen Virol.* mars 2008;89(Pt 3):676-86.
141. Barry G, Varela M, Ratinier M, Blomström AL, Caporale M, Seehusen F, et al. NSs protein of Schmallenberg virus counteracts the antiviral response of the cell by inhibiting its transcriptional machinery. *J Gen Virol.* 1 août 2014;95(8):1640-6.
142. Gouzil J, Fablet A, Lara E, Caignard G, Cochet M, Kundlacz C, et al. Nonstructural Protein NSs of Schmallenberg Virus Is Targeted to the Nucleolus and Induces Nucleolar Disorganization. Perlman S, éditeur. *J Virol.* 1 janv 2017;91(1):e01263-16, /jvi/91/1/e01263-16.atom.

Annexes



Article

Comparative Virus-Host Protein Interactions of the Bluetongue Virus NS4 Virulence Factor

Aurore Fablet ^{1,†}, Cindy Kundlacz ^{1,2,†}, Juliette Dupré ¹, Edouard Hirchaud ³, Lydie Postic ¹, Corinne Sailleau ¹, Emmanuel Bréard ¹, Stéphan Zientara ¹, Damien Vitour ^{1,*,†} and Grégory Caignard ^{1,*,†}

¹ UMR VIROLOGIE, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France; aurore.fablet@vet-alfort.fr (A.F.); cindy.kundlacz@free.fr (C.K.); juliette.dupre@vet-alfort.fr (J.D.); lydie.postic@anses.fr (L.P.); corinne.sailleau@anses.fr (C.S.); emmanuel.breard@anses.fr (E.B.); stephan.zientara@anses.fr (S.Z.)

² IGFL, CNRS UMR5242, ENS Lyon, 69007 Lyon, France

³ Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Viral Genetic and Biosecurity Unit, ANSES, 22440 Ploufragan, France; edouard.hirchaud@anses.fr

* Correspondence: damien.vitour@vet-alfort.fr (D.V.); gregory.caignard@vet-alfort.fr (G.C.); Tel.: +33-(1)-43-96-73-30 (D.V.); +33-(1)-43-96-73-75 (G.C.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Bluetongue virus (BTV) is the etiologic agent of a non-contagious arthropod-borne disease transmitted to wild and domestic ruminants. BTV induces a large panel of clinical manifestations ranging from asymptomatic infection to lethal hemorrhagic fever. Despite the fact that BTV has been studied extensively, we still have little understanding of the molecular determinants of BTV virulence. In our report, we have performed a comparative yeast two-hybrid (Y2H) screening approach to search direct cellular targets of the NS4 virulence factor encoded by two different serotypes of BTV: BTV8 and BTV27. This led to identifying Wilms' tumor 1-associated protein (WTAP) as a new interactor of the BTV-NS4. In contrast to BTV8, 1, 4 and 25, NS4 proteins from BTV27 and BTV30 are unable to interact with WTAP. This interaction with WTAP is carried by a peptide of 34 amino acids (NS4^{22–55}) within its putative coil-coiled structure. Most importantly, we showed that binding to WTAP is restored with a chimeric protein where BTV27-NS4 is substituted by BTV8-NS4 in the region encompassing residue 22 to 55. We also demonstrated that WTAP silencing reduces viral titers and the expression of viral proteins, suggesting that BTV-NS4 targets a cellular function of WTAP to increase its viral replication.

Keywords: Bluetongue virus; NS4; WTAP; protein–protein interaction



Citation: Fablet, A.; Kundlacz, C.; Dupré, J.; Hirchaud, E.; Postic, L.; Sailleau, C.; Bréard, E.; Zientara, S.; Vitour, D.; Caignard, G. Comparative Virus-Host Protein Interactions of the Bluetongue Virus NS4 Virulence Factor. *Viruses* **2022**, *14*, 182. <https://doi.org/10.3390/v14020182>

Annexe 1 : Article publié en janvier 2022 au journal *Viruses*.

L'article porte sur l'interactome établi de la protéine NS4 du BTV ainsi que sur la caractérisation de son interaction avec la protéine bovine WTAP (<https://doi.org/10.3390/v14020182>)

WTAP-bovin	MTNEEPLPKKVR-LSETDFKVM-ARDELILRWKQYEAYVQALEGKYTDLNSNDVTGLRES	58
WTAP-culicoïde	.SV..TIINNKKETG.NASQSLNSSTNSVPE..GNNN.TD..T-RCR.LEEE.AT.KQ.	59
WTAP-bovin	EELKQQQQESARRENILVMRLATKEQEMQECTTQIQYKQVQQPSVAQLRSAMVDPAIN	118
WTAP-culicoïde	.TT....NVDSQ...RL.MR.....DYML..SEY.AA.A.NT.A..N.LL...V.	119
WTAP-bovin	LLFLKMKSELEQTKDKLEQAQNELSAWKFTPDSQTGKKLMAKCRMLIQENQELGRQLSQG	178
WTAP-culicoïde	V..Q.LRQ..QA..A...ET.....N...R.....L.Y...E...KMT.N.	179
WTAP-bovin	RIAQLEAELALQKKYSEELKSSQDELNDFIIQLDEEVEGMQSTILVLQQQLKETRQQLAQ	238
WTAP-culicoïde	.L.K...D..CH.SLCD.V.K..S.MD..LQEI..D.....F...E..AV.VENDR	239
WTAP-bovin	YQQQQSQAAGPSTSRRTTSSEPVGQAEATGKD-----CSRLANGP	277
WTAP-culicoïde	LK.TYEPDHIQK.DE.DTTT.TTTTPLN.NNTLQNDNQLTKPGSEQIVTKINL..TQ..N	299
WTAP-bovin	SNGSSSRQRTSGSGFHREGDTAEDDFPSSPGNGNKASSSSEERTG--RGGSSYVNLQLSAG	335
WTAP-culicoïde	NL-----NSVN..SLVANTNNTS..SVIGSSC.KNENDVTTKTN.ESMNETESPES.KR.	354
WTAP-bovin	YESVDSPTGSENSLTHHSNDTDSSHDPQEEKPVSGKGNRTAASRHVQNGLDSSVNVQGSV	395
WTAP-culicoïde	.DN.K.SDNE---IINPKRT---RRTAAI..LC.-ID.NAGENNKV...--I...SS--	402
WTAP-bovin	L 396	
WTAP-culicoïde	- 402	

Annexe 2 : Comparaison des séquences en acides aminés des formes bovine et culicoïde de WTAP.

L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du programme informatique Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)



Rôle des protéines NS4 et NS5 du virus de la fièvre catarrhale ovine dans les mécanismes de pathogenèse et de transmission interspécifique

Aurore FABLET

Soutenu le 1er décembre 2022

RESUME

La fièvre catarrhale ovine (FCO) est une maladie non zoonotique touchant les ruminants domestiques et sauvages. La maladie est causée par le virus de la fièvre catarrhale ovine, autrement appelé *Bluetongue virus* (BTV), et est transmis par un moucheron hématophage du genre *Culicoides*. Le BTV est un virus non enveloppé appartenant à la famille des *Sedoreoviridae* et au genre *Orbivirus*. Il possède un génome composé de 10 segments d'ARN double brin codant pour 7 protéines structurales (VP1-7) et sept protéines non structurales (NS1-3/3a-4-5/5a). Aujourd'hui, 36 sérotypes de BTV ont été identifiés dans le monde : 24 sérotypes dits classiques et 12 sérotypes « atypiques » de découverte plus récente. Les sérotypes classiques et atypiques se distinguent par leur différence de pathogénicité, de spectre d'hôte et de mode de transmission. En Europe, le sérotype classique BTV-8 a notamment été responsable d'épizootie provoquant une forte mortalité dans les élevages d'ovins, espèce particulièrement sensible à la FCO, mais également dans les cheptels bovins. A l'inverse, des sérotypes atypiques comme le BTV-27 en Corse, n'ont été retrouvés que chez des petits ruminants asymptomatiques. Afin d'identifier des déterminants viraux ou cellulaires expliquant cette différence de pathogénicité et de transmission interspécifique, une recherche sans a priori d'interactions entre les protéines du BTV-8 et -27 et les protéines cellulaires de l'hôte bovin a été réalisée par le système de double-hybride en levure. Dans ce projet, nous avons étudié les interactions établies par les protéines virales NS4 et NS5 qui ont été plus récemment décrites et qui possèdent certaines caractéristiques communes comme leur capacité à inhiber la transcription cellulaire. La protéine NS4 est aussi décrite comme facteur de virulence par sa capacité à inhiber la réponse immunitaire innée de l'hôte. Par des tests d'interaction, utilisant le double-hybride en levure ou une approche biochimique, nous avons identifié 9 protéines cellulaires interagissant avec NS4 ; PAWR, WTAP, KANSL2, AATF, KIF12, MAPK7, BRD2, LUC7L, CCHCR1, ainsi que 5 protéines cellulaires interagissant avec NS5 ; C1QBP, MEGF6, hnRNPk, MATN2 et GRN. Parmi ces interacteurs cellulaires, en étudiant l'impact de leur inhibition sur l'infection de cellules bovines par le BTV, nous avons mis en évidence 2 protéines ayant probablement une fonction antivirale (AATF et C1QBP) et 2 protéines jouant potentiellement un rôle proviral (WTAP et CCHCR1). D'autre part, l'interaction entre NS4 et WTAP s'est révélée spécifique au sérotype 8 du BTV et nous avons pu caractériser les domaines protéiques 22-55 de NS4 et 151-250 de WTAP comme essentiels à l'établissement de l'interaction. Bien que les mécanismes d'action liés à ces interactions restent à élucider, notre travail apporte des pistes de compréhension des fonctions de NS4 et NS5 mais aussi de la réponse cellulaire à l'infection par le BTV.

MOTS-CLES : Virus de la fièvre catarrhale ovine, *bluetongue*, NS4, NS5, interaction protéine-protéine, facteur de virulence, pathogénicité, transmission