Numéro National de Thèse : 2017LYSEN093

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée par
l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Virologie
Discipline : Sciences de la vie

Soutenue publiquement le 20/12/2017, par :
François ENCHERY

Etude de la modulation de la voie canonique d'activation de NF-κB par les protéines non structurales du virus Nipah

---

Devant le jury composé de :

PIQUE Claudine, Directrice de Recherche à l'U1016 INSERM de Paris,	Rapporteure
BOURHY Hervé, Directeur de Recherche à l'Institut Pasteur à Paris,	Rapporteur
LONGHI Sonia, Directrice de Recherche à l'UMR7267 INSERM de Marseille,	Examinatrice
JALINOT Pierre, Directeur de Recherche à l'ENS de Lyon,	Examinateur
HORVAT Branka, Directrice de Recherche à l'U1111 INSERM de Lyon,	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

- Au Docteur **Pierre JALINOT**, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse.

- A mes rapporteurs, les Docteurs **Claudine PIQUE** et **Hervé BOURHY**, qui ont généreusement accepté de guider la réalisation de ce travail.

- Au Docteur **Sonia LONGHI** pour avoir accepté de juger mon travail en tant qu'examinatrice.

- Au Docteur **Branka HORVAT**, qui, en tant que directrice de thèse, a été à mes côtés tout au long de ces trois ans et m'a permis d'atteindre cet objectif par ses conseils et son soutien. Je la remercie tout particulièrement d'avoir mobilisé les ressources nécessaires pour que je puisse terminer ma 3ème année, tout en commençant mon emploi chez Mérial.

- A tous les membres de l'équipe « Immunobiologie des Infections Virales » que j'ai pu côtoyer au cours de ces trois ans et plus particulièrement à :

A **Denis** et **Louis** pour leurs conseils avisés qui m'ont permis d'avancer dans mes recherches tout en gardant confiance. Merci d'avoir porté tant d'intérêt à mes travaux alors que vous n'y étiez pas directement impliqués !

A **Cyrille** pour ta disponibilité et pour toutes tes connaissances, que tu mets si volontiers à la disposition des autres.

A **Claire, Noémie** et **Quentin**, qui, par leur aide et leur motivation, ont très largement contribué à mes résultats.

A **Kévin**, inutile de dire que c'est grâce à toi que je suis là où j'en suis et content d'y être !

A **Carine**, pour les clonages, les surveillances de gels et autres coups de pouce…

A tous mes stagiaires, qui, en plus de leur aide, m'ont permis d'améliorer mes compétences d'encadrement et de pédagogie.

Grâce à vous, le terme d' « équipe » n'est pas usurpé !

- A **Chloé JOURNO** et **Pierre-Olivier VIDALAIN**, qui en tant que membres de mon comité de suivi de thèse, ont suivi ma progression avec bienveillance.

- Aux zoos, pour garder vos portes ouvertes à la recherche !

- Aux membres du laboratoire P4 Jean Mérieux pour les formations, l'indulgence et la gentillesse dans un endroit un peu trop confiné...

- A **Elodie**, pour son soutien moral et logistique, qui est pour une grande part dans la réalisation de cette thèse.

- A ma famille, qui m'a soutenu tout au long de mes « longues » études, 11 ans…

- A tous ceux que je ne peux citer personnellement, membres des plateaux techniques, conférenciers, aides d'un instant, échanges de couloir, qui font de la thèse une succession de bonnes rencontres…

RESUME

Le virus Nipah (NiV) est un paramyxovirus zoonotique du genre *Henipavirus*, qui a émergé en 1998. NiV infecte l'homme et cause des troubles respiratoires et des encéphalites avec une forte létalité. A l'inverse, chez les hôtes naturels de NiV, les chauves-souris de la famille des *Pteropodidae*, l'infection est asymptomatique. Cependant, les mécanismes permettant aux *Pteropodidae* de contrôler l'infection sont inconnus à ce jour. NiV produit des protéines non structurales, V, W et C, qui sont des facteurs de virulence. V, W et C inhibent les voies de l'interféron de type 1. De plus, la protéine W inhibe la production de chimiokines *in vitro* et module la réponse inflammatoire *in vivo*, mais son mécanisme d'action reste inconnu. La voie NF-κB étant le principal régulateur de la réponse inflammatoire, nous avons émis l'hypothèse que W pourrait moduler la voie NF-κB. Nous avons démontré que la protéine W inhibe l'activation de la voie canonique de NF-κB induite par TNFα et IL-1β, effet pour lequel sa région C-terminale spécifique est nécessaire. Nous avons également identifié quels signaux d'import et d'export nucléaires de W sont nécessaires à son effet inhibiteur et ainsi mis en évidence l'importance du trafic nucléo-cytoplasmique de W pour l'inhibition de NF-κB. L'étude des interactions de W avec les protéines cellulaires nous a permis d'identifier un partenaire prometteur connu pour son rôle dans le rétrocontrôle négatif de NF-κB. Enfin, le rôle de W dans l'inhibition de la voie NF-κB a été démontré pendant l'infection par NiV. Les résultats obtenus ouvrent la voie à la compréhension du mécanisme par lequel W module la réponse inflammatoire. Finalement, afin de mieux comprendre le contrôle de l'infection de NiV par son hôte naturel, nous avons généré des lignées cellulaires primaires et immortalisées de chauve-souris *Pteropus giganteus*. Ces cellules devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces chauves-souris contrôlent l'infection virale.

ABSTRACT

Nipah virus (NiV), from *Henipavirus* genus, is a zoonotic paramyxovirus, which emerged in 1998. In humans, it causes acute respiratory distress and encephalitis with a high lethality. Conversely, the natural hosts of NiV, bats from the *Pteropodidae* family, are asymptomatic. The mechanisms by which the *Pteropodidae* control infection are unknown to date. NiV produces non-structural proteins, V, W and C, which are virulence factors. V, W and C inhibit the type 1 interferon pathways. Moreover, W inhibits the production of chemokines *in vitro* and modulates the inflammatory response *in vivo*, but its mechanism remains unknown. The NF-κB pathway being the main regulator of the inflammatory response, we hypothesized that W could modulate the NF-κB pathway. We demonstrated that protein W inhibits the activation of the NF-κB canonical pathway induced by TNFα and IL-1β. The specific C-terminal region of W is necessary for this effect. We have also identified which nuclear import and export signals of W are necessary for its inhibitory effect and thus highlight the importance of the nucleo-cytoplasmic trafficking of W for the inhibition of NF-κB. The study of the interactions of W with the cellular proteins allowed us to identify a promising partner known for its role in the negative feedback of NF-κB. Finally, the role of W in the inhibition of the NF-κB pathway was demonstrated during the infection with NiV. The results obtained open the way to understanding the mechanism by which W modulates the inflammatory response. Finally, to better understand the control of the infection of NiV by its natural host, we generated primary and immortalized cell lines of *Pteropus giganteus* bat. These cells should provide a better understanding of the mechanisms by which these bats control viral infection.

LISTE DES ABREVIATIONS

6HB : Six Helix Bundle (faisceau de 6 hélices)
α-MoRE : alpha helix of Molecular-Recognition-Elements type
AnkRs : répétitions d'ankyrines
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ATP : Adénosine Triphosphate
BAFFR : B cell-Activating Factor Receptor
C : protéine C
CARD : Caspase Activation and Recruitment Domains
CCL : C-C motif Ligand
CD : Cluster of Differentiation
Cdc37 : HSP90 co-chaperone (codée par le gène CDC37)
CDC5L : Cell Division Cycle 5-Like protein
CeV : Cedar virus
cIAP : cellular Inhibitor of Apoptosis Protein
CRM : Chromosomal Maintenance
CTD : domaine C-terminal
CXCL : C-X-C motif Ligand
DI : Defective Interfering (ARN ou particule)
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
F : protéine de fusion
G : glycoprotéine
GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein
GhV : Ghana virus
HEK293T : Human Embryonic Kidney 293 SV40 T antigen
HeV : virus Hendra
hTERT : Human Telomerase Reverse Transcriptase
HR : Heptad Repetition (répétition en heptade)
HSP90 : Heat Shock Protein 90
IFN α/β : Interferon α/β (interférons de types I α et β)
IFNAR : IFNα/β Receptor
IκB : NF-κB Inhibitor
IKK : IκB Kinase
IL : Interleukin
IPS : cellules souches pluripotentes induites
IRF : Interferon-Regulatory Factors

ISG : IFN-Stimulated Gene
JAK1 : Janus Kinase 1
JNK : Jun N-terminal Kinases
ko : knock-out (ce dit pour un gène déficient)
L : Large protein (ARN polymérase)
LGP2 : Laboratory of Genetics and Physiology 2
LMB : Leptomycine B
LUBAC : complexe linéaire d'assemblage d'ubiquitine
MeV : Measles virus (virus de la rougeole)
M : protéine de matrice
MAVS : Mitochondrial Antiviral-Signaling protein
MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MOI : Multiplicity of Infection (ici ratio du nombre de particules virales infectieuses sur le nombre de cellules cibles)
MojV : Mojiang virus
MuV : Mumps virus
MyD88 : Myeloid Differentiation primary-response protein 88
N : nucléoprotéine
NDV : Newcastle Disease virus
NEMO : NF-κB Essential MOdulator
NES : Nuclear export signal (signal d'export nucléaire)
NF-κB : Nuclear Factor-Kappa B
NIK : kinase inductrice de NF-κB
NiV : virus Nipah
NiV-B : souche malaysienne du virus Nipah
NiV-M : souche bangladaise du virus Nipah
NLS : Nuclear Localisation signal (signal de localisation nucléaire)
NTD : domaine N-terminal
P : phosphoprotéine
PAMPS : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR : Poly Chain Reaction
PIV : Parainfluenza virus
PKR : Protein Kinase RNA-activated
PLK : Polo-Like Kinase
PMD : P Multimerization Domain (domaine de tétramérisation de P)
PNS : Protéines Non Structurales (les protéines V, W et C)
PR65A : Serine/threonine-protein Phosphatase 2A 65 kDa Regulatory subunit A alpha
PRPF19 : Pre-mRNA-Processing Factor 19
qPCR : PCR quantitative
RANK : Receptor Activator of NF-κB
RIG-I : Retinoic-acid Inducible Gene 1

RING : Really Interesting New Gene
RIP : receptor interacting protein
RLR : RIG-I like receptor (récepteur de type RIG-I)
RSV : virus respiratoire syncytial
SeV : virus Sendai
SV : Simian virus
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
TAB : TAK1-binding protein
TAK1 : TGFβ-activated kinase 1
TANK : TRAF family member-Associated NF-κB activator
TBK1 : Tank-Binding Kinase 1
TIR : Toll/Interleukin I Receptor
TLR : Toll-like receptor (récepteur de type Toll)
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFR : récepteur à TNF
TNFRSF : TNF Receptor SuperFamily member
TRAF : TNF Receptor-Associated Factor
TRIF : TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ
TRIM : Tripartite Motif protein
TRADD : Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain
TSG101 : Tumor susceptibility gene 101
TYK2 : Tyrosine Kinase 2
V : protéine V
VNT : Virus Neutralisation Test
VSV : virus de la stomatite vésiculeuse
W : protéine W
WB : Western-Blot
WT : wild-type (virus sauvage)

LISTE DES FIGURES

1ère partie : Bibliographie

Figure 1 : *Arbre phylogénétique basé sur les séquences des protéines N de quelques représentants de la famille des Paramyxoviridae, obtenu par la méthode du neighbor-joining.* ***(p. 22)***
Figure 2 : *Localisation géographique des épidémies causées par les Henipavirus et aires de distribution de leurs hôtes réservoirs.* ***(p. 23)***
Figure 3 : *Représentation schématique de la transmission de NiV, de l'hôte réservoir (les chauves-souris frugivores de la famille des Pteropodidae) aux différentes espèces sensibles.* ***(p. 25)***
Figure 4 : *Photo d'une chauve-souris frugivore Pteropus giganteus.* ***(p. 29)***
Figure 5 : *Représentation schématique du génome du virus Nipah.* ***(p. 32)***
Figure 6 : *Résumé des différents sites d'import identifiés dans la protéine W et des partenaires qui leur sont associés.* ***(p. 35)***
Figure 7 : *Représentation schématique du cycle viral de NiV.* ***(p. 39)***
Figure 8 : *Représentation schématique de la voie de production de l'interféron de type 1 déclenchée par les RLRs et les TLRs, et de son inhibition par les protéines de NiV.* ***(p. 45)***
Figure 9 : *Représentation schématique de la voie de réponse à l'interféron de type 1 et de son inhibition par les protéines de NiV.* ***(p. 47)***
Figure 10 : *Réprésentation de la dissémination chez le furet de différents NiV recombinants en fonction de leur incapacité à produire la protéine V ou la protéine W.* ***(p. 55)***
Figure 11 : *A, représentations schématiques des différents domaines protéiques des facteurs de transcriptions de la famille de NF-κB. B, représentations schématiques des différents domaines protéiques des inhibiteurs de NF-κB de la famille des IκBs.* ***(p. 58)***
Figure 12 : *Représentation schématique de la voie canonique NF-κB activée par TNFR.* ***(p. 59)***
Figure 13 : *Représentation schématique de la voie non canonique de NF-κB activée par CD40.* ***(p. 62)***

2ème partie : Résultats

Partie I.

Figure 1 : *Détails sur l'effet de W sur la voie NF-κB.* ***(p. 75)***
Figure 2 : *Effet de la protéine W sur la localisation cellulaire des protéines 14-3-3 en fonction de la localisation cellulaire de W.* ***(p. 77)***
Figure 3 : *Importance de la localisation cellulaire de W et de son interaction avec STAT1 pour son effet sur la voie NF-κB.* ***(p. 79)***
Figure 4 : *Effet de la protéine W sur la voie NF-κB et sur la localisation cellulaire des protéines 14-3-3 en fonction de la localisation cellulaire de W en cellules A549.* ***(p. 80)***
Figure 5 : *Interaction de la protéine W avec les protéines 14-3-3.* ***(p. 82)***
Figure 6 : *Effet de NiV sur la voie NF-κB et implication de la protéine W.* ***(p. 84)***
Figure 7 : *Modèle de travail pour l'étude de la nécessité de 14-3-3 dans l'effet inhibiteur de W sur la voie NF-κB.* ***(p. 87)***

Partie II.

Figure 1 : *Détails sur l'effet de V sur la voie NF-κB.* ***(p. 92)***
Figure 2 : *Exploration des interactions cellulaires des protéines P, V et W de NIV et V de MeV par co-immunoprécipitation.* ***(p. 93)***

Figure 3 : *Interaction de la protéine V de NIV avec UBXN1.* ***(p. 95)***
Figure 4 : *Effet des protéines V et UBXN1 transfectées sur la voie canonique NF-κB en cellules HeLa et HEK293T.* ***(p. 96)***

Partie III.

Figure 1 : *Analyse des profils d'expression des protéines P, V et W de NiV par western-blot.* ***(p. 102)***
Figure 2 : *Mise en évidence de la localisation cellulaire des protéines P, V et W de NiV.* ***(p. 103)***
Figure 3 : *Mise en évidence de la localisation cellulaire des mutants W de NiV.* ***(p. 105)***
Figure 4 : *Mise en évidence de la localisation cellulaire de différents mutants WmNESmNLS de NiV par immunofluorescence.* ***(p. 106)***
Figure 5 : *Mise en évidence de la localisation cellulaire du mutant VmNES de NiV par immunofluorescence.* ***(p. 107)***
Figure 6 : *Résumé des différentes hypothèses formulées et observations faites dans cette partie.* ***(p. 110)***

Partie IV.

Figure 1 : *Photo des lignées cellulaires obtenues à partir des échantillons provenant du zoo de Vienne.* ***(p. 117)***
Figure 2 : *Arbre phylogénétique basé sur la séquence d'ADN mitochondriale D-loop obtenu par la méthode du neighbor-joining.* ***(p. 118)***
Figure 3 : *Cinétique d'infection des cellules de chauve-souris immortalisées PATGV12 et de cellules primaires de poumon par les virus NiV-M et NiV-B par qPCR.* ***(p. 119)***
Figure 6 : *Séquestration de la protéine STAT1 par la protéine V de NIV dans le cytoplasme de cellules de chauve-souris (par immunofluorescence).* ***(p. 121)***
Figure 5 : *Validation du marquage anticorps anti-p65 et de la stimulation avec TNFα dans des cellules de chauve-souris (par immunofluorescence).* ***(p. 122)***

Annexes

Figure 1 : *Co-immunoprécipitation des protéines V et W de NiV avec PR65A.* ***(p. 138)***
Figure 2 : *Détails sur la co-immunoprécipitation de la protéine V avec HSP70.* ***(p. 139)***
Figure 3 : *La protéine V séquestre HSP70 dans le cytoplasme.* ***(p. 140)***

AVANT-PROPOS

Pendant ces trois années, mes travaux m'ont conduit à participer à divers axes de recherche. Malgré le certain éclectisme qui en résulte, ils ont été une source de curiosité, de rencontres et d'ouverture d'esprit, éléments essentiels au cheminement d'un doctorant. Pendant trois ans, de nombreuses opportunités sont apparues du fait de la transversalité des contacts que j'ai eu la chance de créer. Une des principales difficultés a été de devoir faire un choix face à leur incompatibilité. Alors que, le plus souvent, ces choix impliquaient l'orientation de mes recherches, ma dernière année a été marquée par ma décision d'amorcer mon insertion professionnelle en saisissant une opportunité d'emploi correspondant exactement à mon attente. Abandonnant, de ce fait, la possibilité d'un séjour en Inde qui s'annonçait scientifiquement et culturellement enrichissant, cette décision a également radicalement modifié ma façon de travailler, faisant plus que jamais place à l'organisation et à l'encadrement, et m'obligeant à déléguer et à faire confiance. Aussi, je réalise que j'aurais été bien en peine d'imaginer dès son commencement le déroulement de cette thèse. Malgré cela, le fil conducteur de mes travaux aura été le souci de l'observance d'un maximum de rigueur dans l'obtention de mes données. Ainsi, j'ose espérer avoir abordé l'interprétation et la présentation de mes résultats avec toute l'objectivité qui incombe aux recherches scientifiques.

Les axes de recherche sont présentés dans ce manuscrit de façon à ce qu'ils s'articulent autour du sujet central qu'est la modulation de la voie canonique NF-κB par les protéines non structurales du virus Nipah. L'essentiel des travaux expérimentaux et bibliographiques, réalisé pendant ces trois ans, est présenté sous forme d'articles scientifiques et est réuni en une seule et même partie. Pour permette leur bonne compréhension, ils sont précédés d'un résumé bibliographique qui s'attache à présenter le virus Nipah, et notamment les perturbations de l'immunité innée pendant l'infection, et l'activation de la voie NF-κB. Une discussion générale permet d'expliciter le lien existant entre ces différents axes, de les mettre en relation avec les données déjà existantes dans la littérature et d'en dégager un certain nombre de perspectives. Enfin, les travaux réalisés dans le cadre de ces perspectives font l'objet d'une quatrième partie. Elle est l'occasion à travers la présentation de quelques résultats de discriminer les hypothèses pouvant ou non, constituer de nouveaux axes de recherches.

Travailler ensemble est une des composantes essentielles d'une thèse. Aussi, je tiens ici à restituer à chacun la part de travail qui a été la sienne. Outre, l'encadrement de ma directrice de thèse Branka Horvat, de nombreuses personnes ont guidé mon raisonnement et participé à l'élaboration et à l'interprétation des expérimentations : Louis-Maire Bloyet, Denis Gerlier, Chloé Journo, Cyrille Mathieu, Pierre-Olivier Vidalain et Kévin Dhondt. La manipulation du virus Nipah nécessitant un niveau 4 de biosécurité, Noémie Aurine et Cyrille Mathieu ont participé aux expérimentations dans le laboratoire P4 « Jean Mérieux », quand il m'était impossible d'y entrer moi-même. Du fait de ma nouvelle prise de fonction en troisième année, Claire Dumont a été en charge de la réalisation de l'essentiel des protocoles que je lui ai

transmis. Elle a également participé à l'interprétation de ses résultats. Enfin, la participation de plusieurs stagiaires, Nicolas Yaghaian, Romain Chanut, Marion Janona et Quentin Bardin, m'a permis d'alléger la charge de travail et de développer mes compétences d'encadrement.

Table des matières

REMERCIEMENTS **3**

RESUME **5**

ABSTRACT **5**

LISTE DES ABREVIATIONS **7**

LISTE DES FIGURES **11**

AVANT-PROPOS **13**

1ère PARTIE : BIBLIOGRAPHIE **21**

I. DECOUVERTE, EPIDEMIOLOGIE ET DESCRIPTION DU VIRUS NIPAH .. 21

A. Les premiers cas identifiés 21

1. Le virus Hendra, le premier du genre 21

2. La première épidémie du virus Nipah 21

3. Les différentes souches 22

B. Epidémiologie et symptomatologie du virus Nipah 23

1. Fréquence et répartition géographique des épidémies chez l'Homme 23

2. Les espèces susceptibles 24

3. Contamination intra et inter-espèces 24

4. Les tableaux cliniques des infections par NiV 26

5. Traitements 27

C. Les hôtes réservoirs asymptomatiques 27

1. Les espèces réservoirs 27

2. Le caractère asymptomatique de l'infection 29

3. Importance de l'étude de l'hôte réservoir 30

D. Description de la particule virale de NiV 30

1. Classification 30

2. Organisation du génome 31

3. Les protéines virales et leurs fonctions connues 33

4. Organisation de la particule virale 36
E. Le cycle réplicatif 36
1. L'entrée de NiV dans la cellule hôte 36
2. Transcription primaire, édition et gradient des ARNm viraux 37
3. Traduction des ARNm et transcription secondaire 38
4. Réplication du génome 38
5. Assemblage et bourgeonnement 38
II. LE CONTROLE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ANTIVIRALE PAR NiV 41
A. Mise en place de l'immunité antivirale 41
1. Déclenchement de l'immunité innée par les virus à ARN 41
2. Réponse à l'IFN de type 1 et mise en place des défenses antivirales 42
B. Effets des protéines de NiV sur la production de l'IFN 42
1. Effet de la protéine V sur MDA5 et LGP2 42
2. Effets des protéines V et W sur IRF3 43
3. Effet de la protéine C sur IKKα 44
4. Effet de la protéine structurale M sur TRIM6 44
C. Effet commun de P, V et W sur la réponse à l'IFN 45
D. Effets des protéines non structurales de NiV sur la réponse immunitaire innée en contexte infectieux 47
1. Importance et limites de l'étude des protéines non structurales en contexte infectieux 47
2. Effets des protéines non structurales sur la production des cytokines en contexte infectieux *in vitro* 49
3. Effets des protéines non structurales sur la réponse à l'interféron en contexte infectieux *in vitro* 51
4. Rôle des protéines non structurales de NiV *in vivo* 53
III. LA VOIE NF-κB 57

A. Généralités sur la voie NF-κB 57
1. Découverte de la voie..... 57
2. Une famille de facteurs de transcription 57
B. Activation de la voie canonique..... 59
1. Formation des complexes protéiques de transduction du signal 59
2. Activation de l'IKK complexe et dégradation de l'inhibiteur de NF-κB..... 60
B. Activation de la voie non canonique 61
C. Importance de NF-κB pour la réponse immunitaire 63
1. NF-κB à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité acquise 63
2. Modulation de la voie NF-κB par les virus, cas particulier des paramyxovirus 63
OBJECTIFS.....67
2ème PARTIE : RESULTATS 69
I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W..... 69
A. Introduction 69
B. Matériel and méthodes..... 69
1. Culture cellulaire 69
2. Construction des plasmides..... 70
3. Western-blots 70
4. Tests fonctionnels en contexte de transfection..... 71
7. Co-immunoprécipitations..... 72
5. Immunofluorescences..... 72
8. Tests fonctionnels en contexte d'infection..... 73
10. Analyse des résultats..... 73
C. Résultats 74
1. La protéine W inhibe la voie NF-κB via son CTD spécifique 74

2. La localisation nucléaire de W est nécessaire pour inhiber la voie NF-κB, mais pas son interaction avec STAT1 76

3. W co-immunoprécipite avec 14-3-3 et entraîne sa redistribution dans le noyau 81

4. Le CTD de W est impliqué dans l'inhibition de la voie NF-κB par NiV en contexte d'infection..... 83

D. Conclusion de la partie I. 85

II. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB par NiV V 89

A. Introduction 89

B. Matériel et méthodes..... 89

1. Constructions de plasmides..... 90

2. Test de stabilité 90

3. Analyse des résultats..... 90

C. RESULTATS 91

1. La protéine V inhibe la voie NF-κB via son CTD spécifique..... 91

2. NiV V co-immunoprécipite avec STAT1, HSP70 et HSP90, mais ni avec p65 ni avec UBXN1 endogènes..... 93

3. NiV V co-immunoprécipite avec UBXN1 en contexte de co-transfection..... 94

4. Exploration des effets de NiV V et UBXN1 sur la voie canonique NF-κB 96

D. Conclusion de la partie II. 97

III. DETAILS DU MECANISME D'IMPORT ET D'EXPORT DE LA PROTEINE W 101

A. Introduction 101

B. Matériel et méthodes..... 101

C. Résultats 102

1. Localisation cellulaire des protéines P, V et W de NiV 102

2. La localisation nucléaire de W est régie par différents signaux d'import et d'export..... 104

3. Prédictions de la localisation des NLS de W 104

4. Les résidus K323, R324, R343 et K347 ne sont pas nécessaires à la localisation nucléaire de WmNESmNLS 106

5. Le NLS du NTD commun n'est pas fonctionnel en cellules HeLa 107

D. Conclusion de la partie III. 108

IV. DEVELOPPEMENT D'OUTILS *in vitro* POUR L'ETUDE DE L'HOTE NATUREL DE NiV ET RESULTATS PRELIMINAIRES 113

A. Introduction 113

B. Matériel et méthode 114

1. Cultures cellulaires 114

2. Vérification de l'espèce des chauves-souris prélevés 115

3. Infection avec NiV-M et NiV-B 115

4. RT-PCR quantitative 116

5. Immunofluorescence 116

C. Résultats 117

1. Développement de lignées cellulaires de *Pteropus giganteus* . 117

2. Cinétique d'infection des cellules de chauves-souris par NiV .. 118

3. Compatibilité des anticorps commerciaux pour l'étude des voies de signalisation 120

D. Conclusion de la partie IV. 123

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 125

ANNEXES 131

ANNEXE 1 : EXPLORATION DES PARTENARIATS CELLULAIRES DES PROTEINES V ET W DE NIV 133

A. Introduction 133

B. Matériel et méthodes 133

1. Généralités 133

2. Analyse des co-immunoprécipitations par spectrométrie de masse 133
C. Résultats 134
1. Protéines co-immunoprécipitant à la fois avec V et W 134
2. Protéines ne co-immunoprécipitant qu'avec W 135
3. Protéines ne co-immunoprécipitant qu'avec V..... 135
4. Confirmation des co-immunoprécipitations par révélation en WB 137
D. Conclusion de l'Annexe 1 140
ANNEXE 2 : HSP90 CHAPERONING IN ADDITION TO PHOSPHOPROTEIN REQUIRED FOR FOLDING BUT NOT FOR SUPPORTING ENZYMATIC ACTIVITIES OF MEASLES AND NIPAH VIRUS L POLYMERASES..... 145
ANNEXE 3 : UNDERSTANDING THE INTERACTIONS BETWEEN HENIPAVIRUSES AND THEIR NATURAL HOST, FRUIT BTAS: PAVING THE WAY TOWARD CONTROL OF HIGHLY LETHAL INFECTION IN HUMAN..... 145
ANNEXE 4 : RECENT CHALLENGES IN UNDERSTANDING HENIPAVIRUS IMMUNOPATHOGENESIS: ROLE OF VIRAL NONSTRUCTURAL PROTEINS..... 145
REFERENCES 147

1ère PARTIE : BIBLIOGRAPHIE

I. DECOUVERTE, EPIDEMIOLOGIE ET DESCRIPTION DU VIRUS NIPAH

A. Les premiers cas identifiés

1. Le virus Hendra, le premier du genre

En 1994, en Australie, à Hendra (banlieue Nord de Brisbane), 17 chevaux ont été infectés auprès d'une jument décédée quelques jours plus tôt (Selvey et al. 1995). Ils ont présenté des symptômes de fièvre, d'anorexie, de dyspnée, et des sécrétions nasales abondantes. 14 d'entre eux sont morts. Deux cas humains ont également été rapportés : un entraîneur de chevaux et un garçon d'écurie, ayant été en étroit contact avec la jument infectée, ont développé un syndrome grippal. Le garçon d'écurie a récupéré, mais l'entraîneur est mort après avoir montré des signes de thrombose artérielle et d'insuffisances respiratoire et rénale. Le virus isolé à partir d'un rein de l'entraîneur était identique à ceux isolés à partir des poumons des chevaux infectés. Des comparaisons de séquences sur ce virus, nommé virus Hendra (HeV), ont montré qu'il appartenait à la famille des *Paramyxoviridae* (**Figure 1**), mais qu'il ne présentait qu'un faible niveau d'homologie avec d'autres paramyxovirus (L. F. Wang et al. 1998).

2. La première épidémie du virus Nipah

De Septembre 1998 à Juin 1999, une épidémie humaine d'encéphalites a été rapportée en Malaisie. 265 cas ont été recensés, dont 105 morts. Cette épidémie a été associée à des atteintes respiratoires apparues chez des porcs de la région (Chua et al. 1999). Le commerce de ces animaux a d'ailleurs étendu la zone géographique de l'épidémie à Singapour, où 11 cas ont été constatés (dont 1 mort) parmi des employés d'abattoir (Paton et al. 1999). De part des similarités dans la symptomatologie, cet épisode infectieux a tout d'abord été attribué à l'encéphalite japonaise, endémique dans cette région, et dont le porc est un hôte amplificateur (Weaver et Barrett 2004). Un plan de vaccination contre l'encéphalite japonaise et un plan d'éradication des moustiques vecteurs ont été mis en place. Mais leur inefficacité à enrayer l'épidémie, ainsi que certaines caractéristiques épidémiologiques (peu de jeunes enfants atteints), ont poussé les autorités malaisiennes à rejeter cette première hypothèse. Une étude basée sur des images de cerveaux obtenues par résonnance magnétique souligna ultérieurement les différences entre les deux maladies (Lim et al. 2000).

En mars 1999, la mise en contact avec des cellules VERO du liquide cérébrospinal d'un patient décédé a entraîné leur fusion sous forme de syncytia. Cette première isolation est à l'origine du nom « Nipah » donné au virus responsable. En effet, le patient était originaire de Kampung Sungai Nipah, un village de Negeri Sembilan. Les premières observations microscopiques du virus Nipah (NiV) ont mis en évidence des caractéristiques appartenant aux virus de la famille des paramyxovirus (Chua et al. 2000).

Plusieurs antisera contre différents paramyxovirus ont été testés : HeV, le virus de la rougeole (MeV), le virus respiratoire syncytial (RSV) humain, les virus parainfluenza 1 et 3, etc... Seuls des antisera contre HeV ont montré une réaction contre NiV, mais des différences notables dans les études de cross-neutralisation ont indiqué que NiV et HeV, bien qu'ayant des similarités, n'étaient pas identiques (Chua et al. 2000).

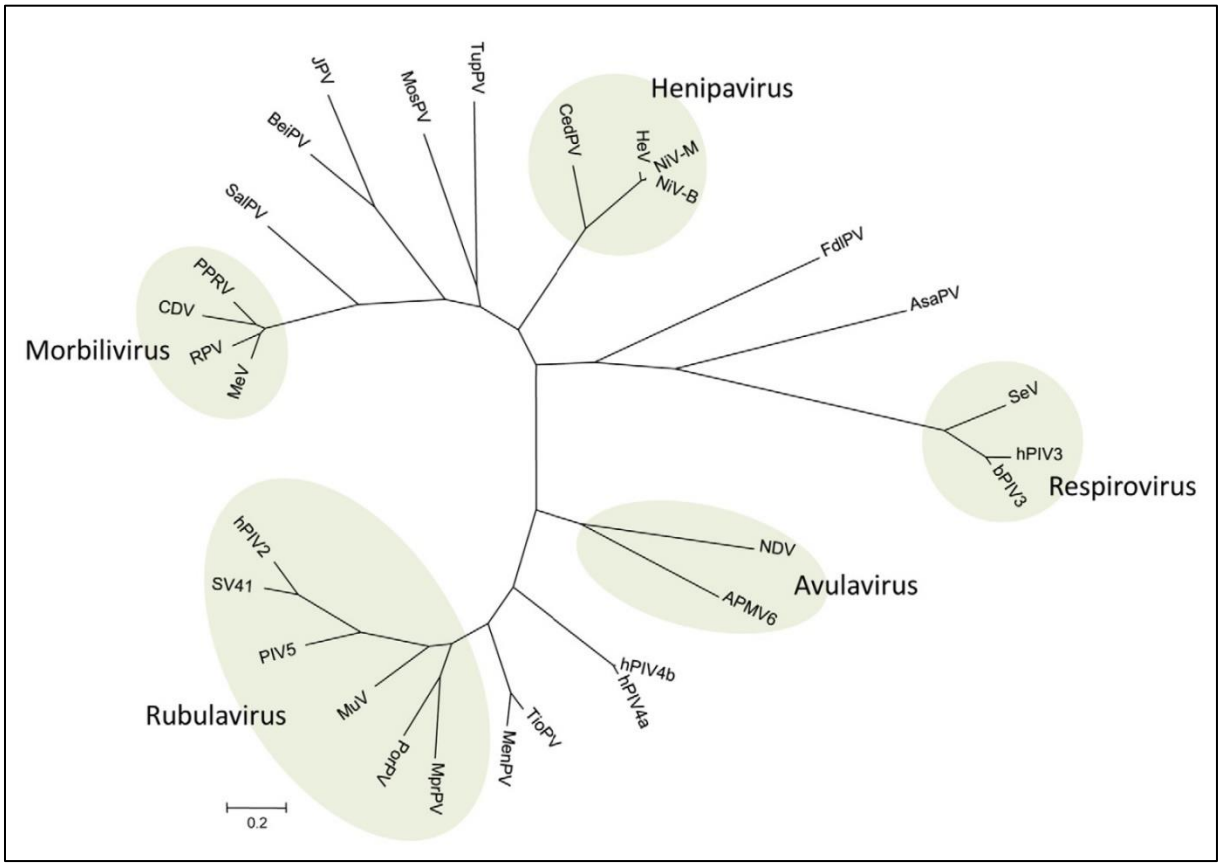


Figure 7 : *Arbre phylogénétique basé sur les séquences des protéines N de quelques représentants de la famille des Paramyxoviridae, obtenu par la méthode du neighbor-joining (Marsh et al. 2012). Abréviations : paramyxovirus aviaire 6 (APMV6), paramyxovirus du saumon atlantique (AsaPV), virus Beilong (BeiPV), virus parainfluenza bovin 3 (bPIV3), virus de la maladie de Carré (CDV), virus Cedar (CedPV), virus du Ferde-lance (FdlPV), virus Hendra (HeV), virus parainfluenza humain 2 (hPIV2), virus parainfluenza humain 3 (hPIV3), virus parainfluenza humain 4a (hPIV4a), virus parainfluenza humain 4b (hPIV4b), virus J (JPV), virus Menangle (MenPV), virus de la rougeole (MeV), virus Mossman (MosPV), virus Mapeura (MprPV), virus des oreillons (MuV), virus de la maladie de Newcastle (NDV), virus Nipah souche Bangladesh (NiV-B), virus Nipah souche Malaisie (NiV-M), virus parainfluenza 5 (PIV5), virus de la Peste-des-petits-ruminants (PPRV), rubulavirus porcin (PorPV), virus Rinderpest (RPV) virus Salem (SalPV), virus Sendai (SeV), virus simien 41 (SV41), virus Tioman (TioPV), paramyxovirus Tupaia (TupPV).*

3. Les différentes souches

Depuis sa première identification, NiV a régulièrement été associé à des épidémies d'encéphalites, notamment en Inde (Chadha et al. 2006), au Bangladesh (Hsu et al. 2004) et aux Philippines (Ching et al. 2015). L'isolement de NiV à partir des échantillons issus

de ces épidémies a permis de distinguer deux souches, nommées Nipah Malaisie (NiV-M) et Nipah Bangladesh (NiV-B), qui ont été génétiquement comparées (Harcourt et al. 2005) (cf. « D. 2. Organisation du génome » dans cette partie).

B. Epidémiologie et symptomatologie du virus Nipah

1. Fréquence et répartition géographique des épidémies chez l'Homme

Des épidémies de NiV ont été recensées régulièrement depuis son émergence dans cinq pays : en Malaisie en 1998, à Singapour en 1999 (Chua et al. 1999), au Bangladesh, en Inde en 2001 (Harit et al. 2006) et aux Philippines en 2014 (Ching et al. 2015) (**Figure 2**). La première épidémie de NiV-M a été décrite en Malaisie et à Singapour. L'épidémie survenue aux Philippines a également été attribuée à cette souche, mais ces données sont contestées. Aucune autre épidémie de NiV-M n'a été observée depuis. Depuis sa première émergence au Bangladesh en 2001 (Hsu et al. 2004), la souche NiV-B a été responsable d'une quinzaine d'épidémies jusqu'en 2014 (Islam et al. 2016), y compris en Inde (Chadha et al. 2006).

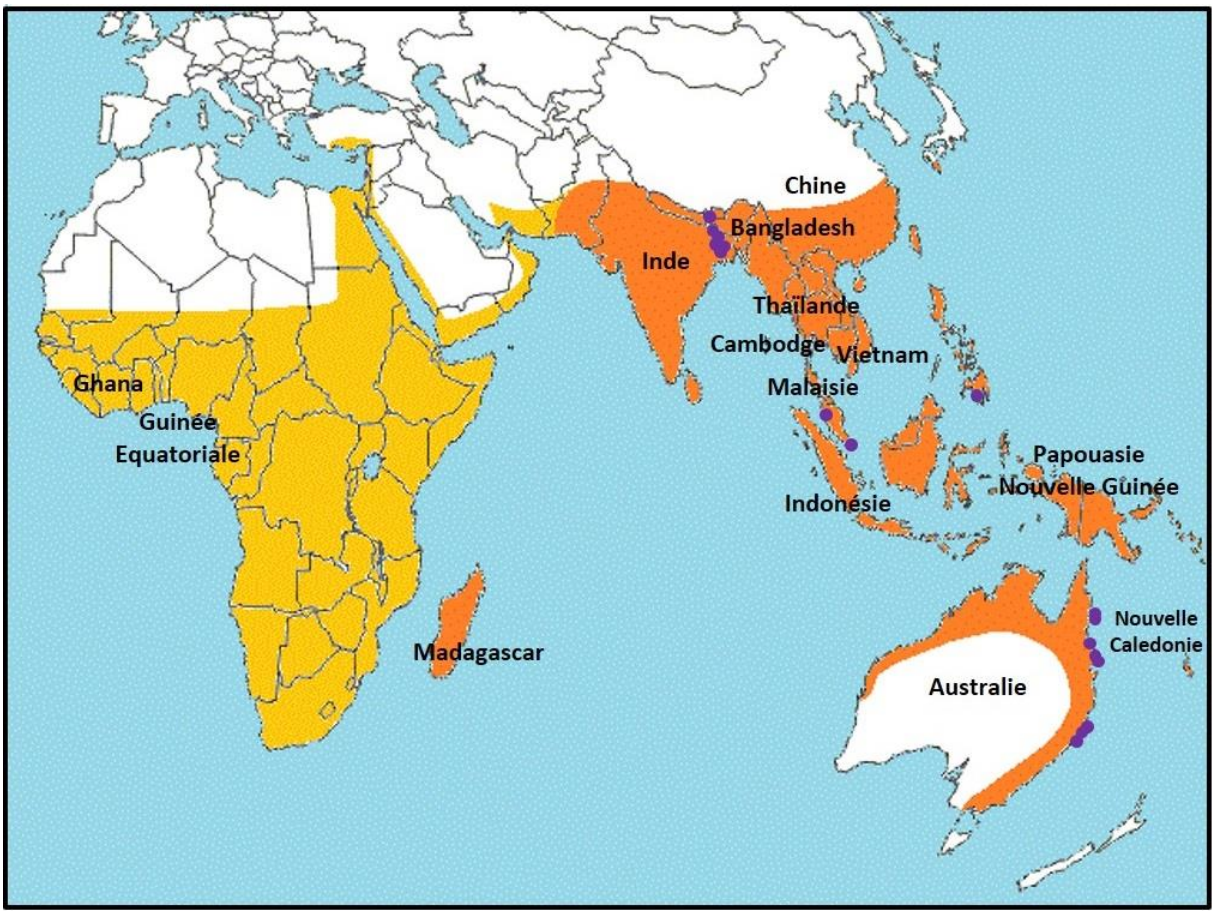


Figure 8 : *Localisation géographique des épidémies causées par les Henipavirus et aires de distribution de leurs hôtes réservoirs. En orange, figure l'aire de distribution des chauves-souris du genre Pteropus. En jaune, figure l'aire de distribution des chauves-souris de la famille des Pteropodidae. Les points violets représentent la localisation des épidémies à HeV (Australie) et à NiV (Bangladesh, Inde, Malaisie, Philippines, Singapour). Les pays indiqués en noir sont les pays où un contact direct (détection virale) ou indirect (sérologie) a déjà été mis en évidence entre Pteropodidae et Henipavirus.*

2. Les espèces susceptibles

Les protéines Ephrines B2 et B3 sont les récepteurs cellulaires d'entrée de NiV et HeV (Xu et al. 2012). Comme ces protéines sont très conservées entre les espèces, NiV et HeV présentent une capacité à infecter de nombreux mammifères, ce qui les distingue des autres membres de leur famille (Eaton et al. 2006). L'infection d'embryons de poulet a également été démontrée (Tanimura et al. 2006). NiV peut ainsi infecter l'Homme, les porcs (Chua et al. 1999), les chiens (Mills et al. 2009) et les chevaux (Ching et al. 2015). Expérimentalement, les chats (D. J. Middleton et al. 2002), cochons d'Inde (Torres-Velez et al. 2008), hamsters (Munster et al. 2012), furets (Satterfield et al. 2015), singes écureuil (Marianneau et al. 2010) et les singes verts d'Afrique (Mire et al. 2016) sont également susceptibles. Les chèvres et les bovins le sont également d'après les analyses sérologiques (Chowdhury et al. 2014). Enfin, les chauves-souris de la famille des *Pteropodidae* ont été identifiées comme les hôtes réservoirs asymptomatiques de NiV (Halpin et al. 2011) (cf. « C. Les hôtes réservoirs asymptomatiques », dans cette partie). A noter que la souris n'est pas susceptible, malgré la présence des récepteurs cellulaires d'entrée des Henipavirus (Dhondt et al. 2013). L'utilisation de ces différents animaux comme modèles expérimentaux de l'infection par NiV a déjà été résumée (Dhondt et Horvat 2013).

3. Contamination intra et inter-espèces

NiV a été détecté dans des écouvillons oro-nasaux et des échantillons urinaires de chauves-souris (**Tableau 1**). L'urine et la salive sont donc les deux principales voies d'excrétion de NiV (Wacharapluesadee et al. 2005). D'autres voies d'excrétion sont également possibles, par exemple par les selles. La transmission du virus au sein d'une colonie de chauves-souris peut avoir lieu soit en partageant les mêmes ressources alimentaires, soit lors de contacts étroits : toilettage mutuel (en particulier entre la mère et son petit jusqu'à l'âge de 3 mois) ou reproduction (**Figure 3**). Bien qu'il y ait une contamination de l'environnement par les urines infectées, le contact étroit entre individus reste le mode de contamination majeur, compte tenu de la fragilité du virus dans l'environnement (Fogarty et al. 2008). De plus, le partage d'un même lieu de nidification par plusieurs colonies d'espèces différentes favoriserait une possible transmission inter-espèce.

Lors des épidémies de NiV-M, le virus semble toujours passer de la chauve-souris à l'Homme par l'intermédiaire d'un hôte amplificateur (**Figure 3**). Lors de la première épidémie de NiV-M en Malaisie (Chua et al. 1999), les porcs ont pu se contaminer par l'ingestion de fruits souillés par la salive ou l'urine de chauves-souris (Chowdhury et al. 2014) et les éleveurs ont été contaminés par contacts avec leurs animaux. A Singapour, les employés d'abattoir ont été infectés suite à la manipulation de carcasses de porcs originaires de Malaisie (Paton et al. 1999). Lors de la deuxième épidémie de NiV-M aux Philippines en 2014, c'est le cheval qui a joué le rôle d'hôte amplificateur, avec notamment une contamination après manipulation en

abattoir ou après consommation de viande (Ching et al. 2015). Une transmission interhumaine secondaire a également été mise en évidence lors de cette épidémie.

En revanche, les premiers cas humains d'infection à NiV-B au Bangladesh et en Inde ont toujours été consécutifs à une consommation directe de fruits ou de jus de fruits contaminés par les urines ou par la salive de chauve-souris (**Figure 3**) (Luby et al. 2006). En effet, la consommation de sève de palmier dattier a été identifiée comme un facteur de risque majeur d'infection à NiV (Gurley et al. 2017). Des transmissions interhumaines de NiV ont également été mises en évidence avec NiV-B.

A noter que la transmission peut également se produire par contact direct entre l'Homme et les chauves-souris. En effet, le dépeçage de viande de chauve-souris, la consommation de cette viande, les morsures, les griffures et l'exposition à l'urine ont été identifiés comme des facteurs en lien avec la séropositivité aux Henipavirus détectée chez une partie de la population au Cameroun (Pernet et al. s. d.) et au Ghana (Anti et al. 2015).

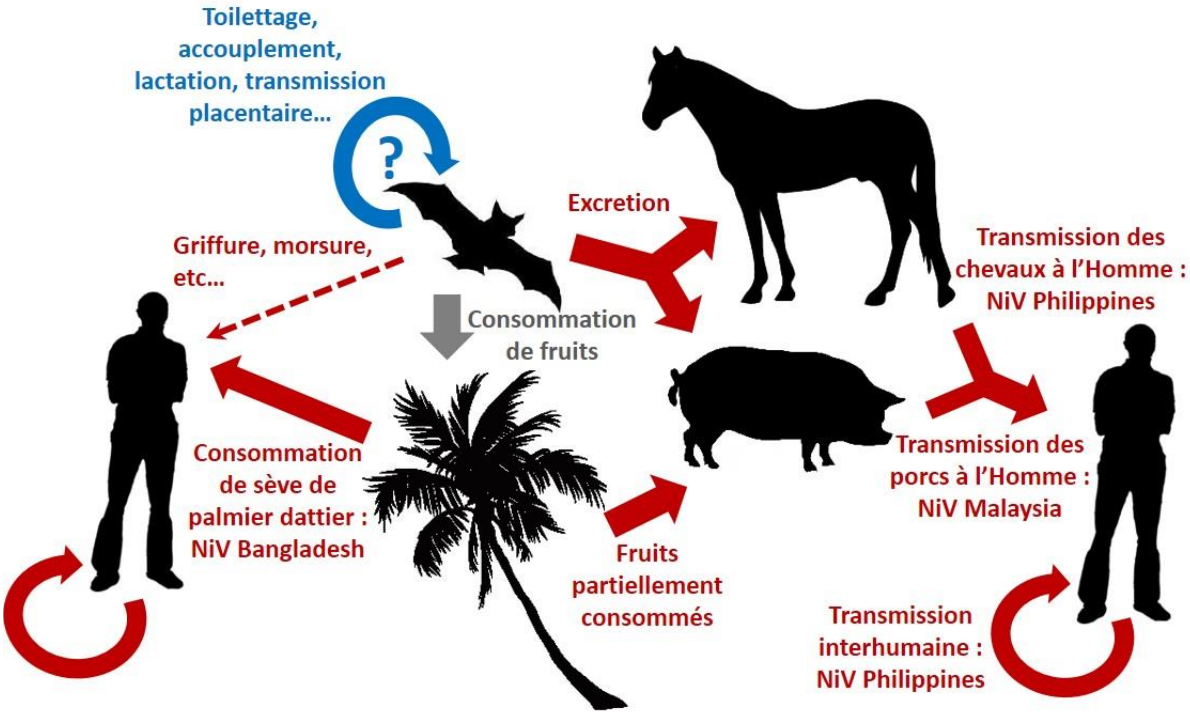


Figure 9 : *Représentation schématique de la transmission de NiV, de l'hôte réservoir (les chauves-souris frugivores de la famille des Pteropodidae) aux différentes espèces sensibles. Les flèches bleues représentent la transmission asymptomatique au sein du réservoir naturel et les flèches rouges indiquent la transmission provoquant une maladie chez l'espèce sensible. Les différents facteurs contributifs sont indiqués à côté des flèches.*

4. Les tableaux cliniques des infections par NiV

Le tableau clinique de l'infection humaine par NiV provient de l'étude de 94 patients de la première épidémie en Malaisie (Goh et al. 2000). Les symptômes généraux sont l'hyperthermie (97% des patients), des maux de tête (65%), des vertiges (36%), des vomissements (27%), une toux sèche (14%) et une myalgie (12%). Les symptômes neurologiques les plus courants sont une diminution ou absence de réflexes (56%) associée à une diminution du niveau de conscience (55%), des pupilles anormales (52%), un réflexe vestibulo-oculaire anormal (38%), une myoclonie segmentaire (32%), un syndrome méningé (28%), de l'épilepsie (23%), un nystagmus (16%). Lors de cette première épidémie la mortalité a été de 40%. Dans les épidémies suivantes au Bangladesh et en Inde, la part plus importante de symptômes respiratoires (Chong et al. 2008) et une augmentation de la mortalité, pouvant atteindre 100% (Marsh et al. 2012), constituent les différences majeures dans les tableaux cliniques. Chez les patients guéris, il a été constaté une rechute d'encéphalites dans 7,5% des cas pour NiV-M (Tan et al. 2002), et 18% pour NiV-B (Sejvar et al. 2007). L'épidémie de NiV aux Philippines a été rattachée à la souche Malaisienne (Ching et al. 2015). Parmi les 17 cas humains identifiés, 11 patients ont présenté une encéphalite sévère, 1 seul a présenté une méningite et 5 patients ont développé un syndrome grippal. La mortalité lors de cette épidémie a été de 53%, mais n'a concerné que les patients atteints d'encéphalite. Au niveau tissulaire, une vascularite est observée chez toutes les espèces susceptibles et quel que soit la souche (Wong et al. 2002). Les souches NiV-M et NiV-B ont également été comparées lors d'infections expérimentales de singes verts d'Afrique inoculés avec 5.10^5 PFU pour moitié par voie intranasale et pour l'autre moitié par voie intratrachéale (Mire et al. 2016). Les différences cliniques observées chez les singes entre les deux souches semblent correspondre à celles observées chez l'Homme. En effet, les singes infectés avec NiV-B ont présenté des symptômes respiratoires plus sévères que ceux infectés avec NiV-M, ainsi qu'une mortalité plus importante : 100% avec NiV-B contre 50% avec NiV-M. Cependant, une étude plus récente réalisée sur des singes verts d'Afrique a montré qu'une mortalité de 100% était atteinte avec NiV-M en inoculant 10^4 PFU par voie intra-trachéale (Cong et al. 2017).

Chez le porc adulte, l'infection par NiV est généralement asymptomatique. Certains individus présentent néanmoins une forte toux (Mohd et al. 2000). Les porcelets infectés avant sevrage présentent des difficultés respiratoires, une faiblesse des membres et des signes neurologiques. La mortalité est de 40% dans cette tranche d'âge. Après le sevrage, les porcelets infectés développent un syndrome fébrile aigu (température corporelle > 39,9°C), des difficultés respiratoires associées à une forte toux sèche et une hémoptysie pour les cas les plus sévères. Des signes neurologiques et des boiteries peuvent également être observés. La morbidité atteint 100 % et la mortalité 5 % dans cette tranche d'âge. Une infection expérimentale de porcs a confirmé les symptômes observés lors de l'épidémie en Malaisie (Middleton et al. 2002).

Sept des huit chevaux infectés par NiV-M aux Philippines, et observés avant leur mort, ont montré des signes neurologiques (Ching et al. 2015) : inclinaison de la tête, ataxie, marche en cercle.

5. Traitements

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif ayant été commercialisé contre NiV chez l'Homme. Les traitements curatifs potentiels ont déjà été résumés (Vigant et Lee 2011). L'utilisation empirique de la ribavirine lors de la première épidémie de NiV révèle une efficacité incertaine (Freiberg et al. 2010 ; Rockx et al. 2010). D'autres thérapies sont actuellement à l'étude, comme l'utilisation de peptides inhibiteurs de la fusion virales (Porotto et al. 2010), d'anticorps neutralisants (Bossart et al. 2009), ou encore l'utilisation de poly(I)-poly($C_{12}U$) (Georges-Courbot et al. 2006). De même, aucun traitement prophylactique n'est disponible chez l'Homme. Pourtant, des méthodes vaccinales ont montré leur efficacité chez le porc (Weingartl et al. 2006) et un vaccin est déjà commercialisé pour les chevaux (Middleton et al. 2014).

A ce jour, les mesures d'hygiène représentent les meilleures solutions pour éviter de nouvelles épidémies. La connaissance de l'épidémiologie de NiV permet d'élaborer des stratégies sanitaires efficaces : la protection des boxes de chevaux, l'arrêt de la commercialisation de sève de palmier dattier, la mise en place de nattes de bambou autour des sites de récolte de la sève (Nahar et al. 2014), l'interdiction de la consommation de viande de chauve-souris (Pernet et al. s. d.), etc... NiV étant un virus enveloppé, sa résistance dans l'environnement est limitée (Fogarty et al. 2008). Des mesures simples de décontamination peuvent également éviter les infections.

NiV a été classé agent pathogène de niveau 4, dont la manipulation nécessite le plus haut niveau de confinement, du fait de l'absence chez l'Homme de traitement curatif ou prophylactique, de son pouvoir pathogène et de sa contagiosité. Ces éléments, ainsi que sa létalité pour un large spectre de mammifères, en font également un agent potentiel de bioterrorisme (Lam 2003). En 2015, l'OMS a placé NiV dans la liste prioritaire des huit agents pathogènes susceptibles de provoquer des épidémies sévères dans un proche avenir (Sweileh 2017).

C. Les hôtes réservoirs asymptomatiques

1. Les espèces réservoirs

Les chauves-souris frugivores ont rapidement été identifiées comme les hôtes naturels de NiV, et plus particulièrement, les chauves-souris de la famille des *Pteropidae* (Halpin et al. 2011). *Pteropus vampyrus* est généralement présenté comme le principal hôte réservoir de NiV. Cependant, plusieurs autres chauves-souris de l'espèce *Pteropus* (*P. giganteus*, *P. poliocephalus*, *P. lylei*, *P. hypomelanus* ...) ainsi que des chauves-souris non *Pteropus*

(*Cynopterus brachyotis*, *Cynopterus sphinx, Eonycteris spelaea,* etc…) ont été trouvées séropositives pour NiV avec une séroprévalence variant de 1,7 (pour *P. rufus*) à 41,9 % (pour *Rousettus leschenaulti*) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : *Liste non exhaustive des études réalisées pour détecter NiV, directement ou indirectement, chez les chauves-souris de la famille des Pteropodidae. Le ratio présente le nombre d'individus (ou PU = pool d'échantillons urinaires) trouvés positifs chez l'espèce testée, en fonction de la technique utilisée (Test) : isolement (sur cellules VERO), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), VNT (Virus Neutralisation Test), PCR (Poly Chain Reaction), Luminex.*

Espèce	Ratio*	Pays	Test	Référence
Cynopterus brachyotis	2/56	Malaisie	VNT	(Yob et al. 2001)
Cynopterus sphinx	3/109	Vietnam	ELISA	(Hasebe et al. 2012)
Eidolon dupreanum	14/73	Madagascar	ELISA	(Iehlé et al. 2007)
Eonycteris spelaea	2/38	Malaisie	VNT	(Yob et al. 2001)
Pteropus giganteus	2/44	Bangladesh	ELISA	(Hsu et al. 2004)
	1/31	Inde		(Yadav et al. 2012)
Pteropus hypomelanus	2 /263 PU	Malaisie	Isolement	(Chua et al. 2002)
	4/26	Thaïlande	ELISA	(Wacharapluesadee et al. 2005)
Pteropus lylei	50/408 2/769 PU	Cambodge	ELISA Isolement	(Reynes et al. 2005)
	76/813	Thaïlande	ELISA	(Wacharapluesadee et al. 2005)
Pteropus rufus	6/349	Madagascar	ELISA	(Iehlé et al. 2007)
Pteropus vampyrus	16/84 30/73	Indonésie	ELISA VNT	(Sendow et al. 2010)
	1/19	Malaisie	Isolement	(Sohayati et al. 2011)
	1/39	Thaïlande	ELISA	(Wacharapluesadee et al. 2005)
Pteropus tonganus ?	3/14	Nouvelle Calédonie	-	(International Society for Infection Diseases 2015)
Rousettus leschenaulti	5/16	China	ELISA	(Li et al. 2008)
	31/74	Vietnam	ELISA	(Hasebe et al. 2012)

Les *Pteropodidae* appartiennent au sous-ordre des *Megachiroptera*, ou au sous-ordre des *Yinpterochiroptera* selon la nouvelle classification, comprenant environ 170 espèces (Enchéry et Horvat 2017). Elles sont présentes dans des zones au climat tropical, sur une aire géographique s'étendant de l'Afrique de l'Ouest à l'Australie (**Figure 2**). La plupart de ces chauves-souris sont frugivores ou nectarivores, ce qui explique leur répartition dans des régions tropicales. Les *Pteropodidae* peuvent parcourir plusieurs milliers de kilomètres pour trouver leur nourriture. Une fois la nourriture localisée, elles nichent dans des arbres, en colonies pouvant atteindre plusieurs milliers d'individus. Du fait de la proximité d'installations agricoles ou de vergers, ces chauves-souris sont considérées comme nuisibles par les agriculteurs locaux. Parmi les *Pteropodidae*, le genre *Pteropu*s représente environ soixante espèces. Elles sont largement présentes en Asie du Sud-Est, dans les îles de l'Océanie et en

Australie (**Figure 2**). Certaines chauves-souris *Pteropus* peuvent atteindre une envergure de 1,7 mètre, comme par exemple *P. giganteus* (**Figure 4**). En raison de leur grande taille, de leur pelage dense, et de leurs oreilles pointues, les *Pteropus* sont familièrement appelées « renard volant ».

2. Le caractère asymptomatique de l'infection

L'infection d'un hôte réservoir est le plus souvent asymptomatique, alors qu'elle entraîne une maladie dans d'autres espèces. La coévolution à long terme entre NiV et ses hôtes naturels a pu conduire à la mise en place d'un d'équilibre. Cependant, les facteurs régissant le maintien de cet équilibre demeurent largement inconnus (Hughes et al. 2007). Chez la plupart des mammifères, l'infection par NiV-M entraîne des symptômes cliniques aigus. L'infection expérimentale des chauves-souris *P. poliocephalus*, *P. alecto* et *P. vampyrus* par NiV est asymptomatique (Middleton et al. 2007 ; Halpin et al. 2011) sans apparition des lésions organiques observées dans les cas aigus des autres espèces (Williamson et al. 2000 ; Middleton et al. 2002). La proportion de *Pteropodidae* infectées par NiV (**Tableau 1**), leur capacité à contrôler l'infection et l'absence apparente de maladie désignent les chauves-souris frugivores comme hôtes réservoirs des *Henipavirus*.



Figure 10 : *Photo d'une chauve-souris frugivore Pteropus giganteus. La taille et la morphologie particulière de cette chauve-souris justifient son nom courant de « renard volant ». Cette espèce est largement répandue en Inde et au Bangladesh.*

3. Importance de l'étude de l'hôte réservoir

Les chauves-souris de la famille des *Pteropodidae* sont les hôtes réservoirs asymptomatiques de NiV et HeV, deux paramyxovirus zoonotiques, hautement pathogènes pour de nombreuses autres espèces de mammifères, dont l'Homme. De nombreux facteurs exacerbent le risque d'épidémie causée par les Henipavirus :

- Les *Pteropodidae* sont présentes sur une importante aire géographique et peuvent opérer des migrations sur plusieurs milliers de kilomètres.
- L'évolution démographique et la déforestation favorisent les contacts entre chauves-souris et Homme.
- Des analyses sérologiques et des PCR ont mis en évidence l'existence de virus « Henipa-like » encore non caractérisés, notamment chez des chauves-souris africaines (Drexler et al. 2009 ; Hayman et al. 2011) et brésiliennes (de Araujo et al. 2017).

Ce qui est connu des relations entre *Henipavirus* et *Pteropodidae* a déjà été résumé (cf. « I. UNDERSTANDING THE INTERACTION BETWEEN HENIPAVIRUSES AND THEIR NATURAL HOST, FRUIT BATS: PAVING THE WAY TOWARDS CONTROL OF HIGHLY LETHAL INFECTION IN HUMANS », dans la 4ème partie). Cependant les bases du fort pouvoir pathogène des *Henipavirus* et les mécanismes permettant à l'hôte réservoir de contrôler l'infection restent à ce jour mal compris. Ces éléments, associés au fait que les chauves-souris sont les réservoirs de nombreux virus émergents (Calisher et al. 2006), montrent l'importance de mieux comprendre les spécificités de la réponse immunitaire des chauves-souris. De plus, peu d'études d'infection des chauves-souris par les Henipavirus ont été réalisées, compte-tenu des différentes souches (NiV-M et NiV-B) et des différentes espèces de chauves-souris présentes en Asie du Sud-Est. Il est possible que les relations hôtes pathogènes, permettant aux chauves-souris de limiter l'infection par NiV tout en permettant au virus de circuler, soient plus spécifiques que ce qui est admis actuellement.

D. Description de la particule virale de NiV

1. Classification

NiV est un virus enveloppé dont le génome est composé d'un ARN de polarité négative (sens 3' - 5') (**Figure 5**), il appartient donc au groupe 5 de la classification de Baltimore. Cet ARN est non-segmenté, ce qui classe NiV dans l'ordre des *Mononegavirales*. Cet ordre comprend huit familles, les *Bornaviridae*, les *Filoviridae,* les *Mymonaviridae*, les *Nyamiviridae*, et les *Paramyxoviridae* (à laquelle NiV appartient), les *Pneumoviridae*, les *Rhabdoviridae* et les *Sunviridae*. Au sein de la famille des *Paramyxoviridae*, l'homologie entre deux séquences du gène N de deux virus est de 39 à 49 % si les virus sont issus de genres différents et de 56 à 78 % pour des virus d'un même genre. La séquence du gène N de NiV a une homologie de 78 % avec celle de HeV, mais n'a pas plus de 49 % avec celles des autres membres de la famille des

Paramyxoviridae (Chua et al. 2000). NiV et HeV sont donc les premiers représentants d'un nouveau genre, le genre *Henipavirus* (**Figure 1**), dont le nom a été formé par la contraction des deux mots Hendra et Nipah. Le genre *Henipavirus* est relativement plus proche des genres *Morbillivirus* et des *Respirovirus* que des autres genres parmi les *Paramyxoviridae* (Harcourt et al. 2001). Depuis, le genre *Henipavirus* s'est enrichi des GhV (Ghana virus) (Drexler et al. 2009), CeV (Cedar virus) (Marsh et al. 2012) et MojV (Mojiang virus) (Wu et al. 2014).

2. Organisation du génome

Le génome de NiV-M contient 18246 nucléotides et celui de NiV-B, 18252 nucléotides (Harcourt et al. 2005). Ces deux longueurs sont des multiples de 6, suggérant que NiV suit la « règle de six » (Kolakofsky et al. 2005), ce qui a été démontré par un test de réplication de minigénome (Halpin et al. 2004). Les 6 nucléotides supplémentaires du génome de NiV-B sont localisés dans la région non codante 5' du gène F (Harcourt et al. 2005). La longueur moyenne des génomes au sein de la famille des *Paramyxoviridae* est de 15,5 kb, le génome de NiV est donc parmi les plus longs (Harcourt et al. 2001). A l'extrémité 3' du génome, une séquence appelée « Leader » de 52 nucléotides (longueur conservée parmi les *Paramyxoviridae*) permet l'initiation de la transcription et de la réplication. A l'extrémité 5', une séquence appelée « Trailer » de 30 nucléotides (longueur non conservée parmi les *Paramyxoviridae*) contient la séquence complémentaire du promoteur antigénomique de la réplication. La longueur exceptionnelle du génome de NiV est due à la séquence codante du gène P et aux régions 3' non codantes de certains gènes, qui sont de tailles plus importantes.

Entre ces séquences « Leader » et « Trailer », le génome de NiV comporte 6 gènes N, P, M, F, G et L, codant pour la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la protéine de fusion (F), la glycoprotéine (G) et l'ARN polymérase (L, car appelée « large protein » en anglais) respectivement (Harcourt et al. 2000 ; Harcourt et al. 2001) (**Figure 5**). Chaque gène est flanqué à son extrémité 3' d'une séquence permettant l'ajout d'une coiffe et à son extrémité 5' d'une séquence permettant l'ajout d'une queue poly(A). Une région intergénique (3'-GAA-5') est présente entre chaque gène. NiV, HeV et le virus Tupaia sont les seuls membres des *Paramyxoviridae* à ne pas avoir de variabilité dans leur triplet nucléotidique intergénique.

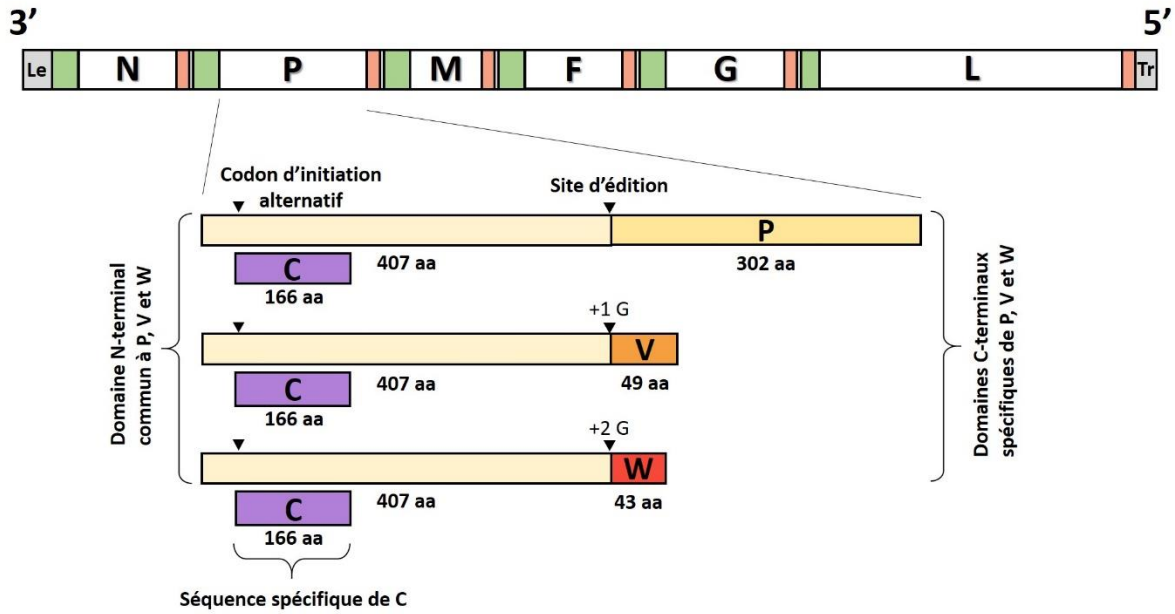


Figure 11 : *Représentation schématique du génome du virus Nipah. L'ARN simple brin non segmenté de polarité négative (3' - 5') est représenté en haut de la figure. En blanc, sont représentées les séquences codantes de chacun des 6 gènes. En gris sont représentées les séquences Leader (Le) de 52 nucléotides, Trailer (Tr) de 30 nucléotides et les séquences GAA intergéniques. En vert sont représentées les régions non codantes 3' de chaque gène, responsables de l'ajout de la coiffe. En rouge sont représentées les régions non codantes 5' de chaque gène, responsables de l'ajout de la queue poly(A). Les tailles des régions non codantes 3' sont de 586, 469, 200, 412, 504 et 67 nucléotides pour les gènes N, P, M, F, G et L respectivement. Les tailles des régions non codantes 5' sont de 57, 105, 100, 284, 233 et 153 nucléotides pour les gènes N, P, M, F, G et L respectivement. Les produits protéiques P, V, W et C du gène P sont représentés en bas de la figure.*

Le gène P code également pour trois protéines V, W et C, dites non structurales. Au cours de la transcription, la polymérase L peut ajouter une ou plusieurs guanines (jusqu'à 14) au niveau d'un site d'édition situé dans le gène P (Lo et al. 2009). L'ajout de 1, 4, 7, 10 ou 13 guanines décale le cadre de lecture de +1 : l'ARNm ainsi édité permet la production de la protéine V. L'ajout de 2, 5, 8, 11, 14 guanines décale le cadre de lecture de +2 : l'ARNm ainsi édité permet la production de la protéine W. L'ajout de 3, 6, 9, 12 guanines rétablit le cadre de lecture de la protéine P. Ainsi les protéines P, V et W partagent le même domaine N-terminal (NTD) (jusqu'au site d'édition), mais ont chacune un domaine C-terminal (CTD) spécifique. La protéine C est produite à partir d'un second codon alternatif d'initiation de la traduction, situé en aval de celui des protéines P, V et W (**Figure 5**). La protéine C peut donc être produite à partir des ARNm des protéines P, V ou W, et n'a aucune similarité de séquence avec ces trois protéines. L'usage potentiel d'un troisième codon d'initiation de la traduction alternatif, situé après les deux autres, permettait la traduction d'une « petite C » amputée des 58 premiers acides aminés N-terminaux.

3. Les protéines virales et leurs fonctions connues

La protéine N (532 acides aminés) de NiV a des caractéristiques et des fonctions très similaires à celles des autres *Paramyxoviridae* (Yabukarski et al. 2014). La N est composée de deux régions : une région globulaire appelée N_{CORE} (acides aminés 1 à 371) et une région désordonnée appelée N_{TAIL} (acides aminés 372 à 532). La région N_{CORE} est composée d'un domaine N-terminal et d'un domaine C-terminal entre lesquels peut s'enchâsser l'ARN. Les protéines N forment des homopolymères par interaction entre leurs N_{CORES}. Ainsi, une des fonctions de la N est de s'assembler pour recouvrir un ARN simple brin, formant ainsi une structure hélicoïdale caractéristique. Exprimées seules, les protéines N s'assemblent autour d'ARNs cellulaires. Mais en contexte d'infection virale, la N interagit avec la protéine P pour rester dans une conformation (appelée N^0), propice à l'assemblage. Le complexe N^0-P permet l'assemblage de la N autour de l'ARN génomique ou antigénomique naissant. Ainsi, la N des *Paramyxoviridae* encapside entièrement l'ARN génomique et anti-génomique formant des complexes ribonucléoprotéiques appelés nucléocapsides. Cette couverture intégrale des ARNs génomiques et anti-génomiques prévient l'hybridation entre les brins complémentaires d'ARN viraux, protège de l'action des ribonucléases cellulaires et est nécessaire à l'intégrité du génome viral. Comme pour les autres paramyxovirus, chaque N recouvrant précisément 6 nucléotides, la longueur du génome de NiV est un multiple de 6, expliquant ainsi la « règle de 6 » (Halpin et al. 2004 ; Kolakofsky et al. 2005).

La protéine P (709 acides aminés) est composée de quatre régions : une région N-terminale désordonnée (acides aminés 1 à 469) qui contient le site MoRE d'interaction avec le domaine C-terminal du N_{CORE}, une région ordonnée hélicoïdale (acides aminés 470 à 578) appelée PMD (P multimerization domain) responsable de la tétramérisation de P (Blocquel et al. 2013), d'un « linker » (acides aminés 579 à 659) et d'un domaine C-terminal appelé domaine X (acides aminés 660 à 709) responsable de la liaison avec une hélice alpha de type « éléments de reconnaissance moléculaire » (α-MoRE) localisé en partie C-terminal de la N_{TAIL} (Chan et al. 2004). Les PMDs sont des longues hélices α s'assemblant parallèlement en tétramères pour former une superhélice, ou coiled-coil (Bruhn et al. 2014). En plus de son rôle de stabilisation de la N, P est un co-facteur essentiel de la transcription/réplication. En effet, chez le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), la multimérisation de P est indispensable pour la réplication du génome virale (Chen et al. 2006). De plus, la P interagit avec le domaine N-terminal de la L pour permettre son ancrage à la nucléocapside. Le site exact de cette interaction varie en fonction des paramyxovirus. Chez MeV par exemple, il se situe sur le domaine C-terminal de P, en partie sur le PMD (Cevik et al. 2004). Une récente étude de notre équipe a également mis en évidence que les protéines P de MeV, NiV et VSV sont indispensables pour le bon repliement par HSP90 (Heat Shock Protein 90) de leurs protéines L respectives (Bloyet et al. 2016). Le modèle suivant a ainsi été proposé : la protéine P agit comme un soutien transitoire de la polymérase virale pour la stabiliser, possiblement pendant sa synthèse. Ce soutien peut se produire via l'interaction entre le domaine C-terminal de P et le domaine N-terminal de L. P évite ainsi l'agrégation de L en complexes insolubles et permet

son bon repliement par HSP90. (cf. « II. HSP90 CHAPERONING IN ADDITION TO PHOSPHOPROTEIN REQUIRED FOR FOLDING BUT NOT FOR SUPPORTING ENZYMATIC ACTIVITIES OF MEASLES AND NIPAH VIRUS L POLYMERASES » dans la 3ème partie). En outre, la protéine P est aussi impliquée dans le contrôle de la réponse immunitaire antivirale (cf. « II. LE CONTROLE DE LA REPONSE INNEE ANTIVIRALE PAR NiV » dans cette partie).

La protéine M (335 acides aminés) est l'élément essentiel de l'assemblage du virus (Watkinson et al. 2016). Elle interagit avec la queue cytoplasmique de la glycoprotéine virale membranaire G et avec la nucléocapside. Elle permet ainsi l'accumulation du génome encapsidé à la membrane cellulaire. Elle permet également le bourgeonnement de la particule virale pour lequel des motifs tardifs YMYL (Ciancanelli et al. 2006) et YPLGVG (Patch et al. 2008) sont requis. Dans les premiers temps de l'infection, la protéine M est localisée dans le noyau de la cellule. Elle est ensuite redirigée vers le cytoplasme, puis s'accumule à la membrane cytoplasmique. Ce transport cellulaire est permis par un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'export nucléaire (NES), qui sont essentiels à sa fonction (Wang et al. 2010). Enfin, la protéine M favorise la stabilité et l'infectivité des particules virales formées (Dietzel et al. 2016). En outre, la protéine M est aussi impliquée dans le contrôle de la réponse immunitaire antivirale (cf. « II. LE CONTROLE DE LA REPONSE INNEE ANTIVIRALE PAR NiV » dans cette partie).

La protéine F (546 acides aminés) est une glycoprotéine membranaire responsable de la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur F0 qui nécessite un clivage postraductionnel endosomal par la cathepsine L (Pager et al. 2006). Il en résulte un hétérodimère mature F1 + F2, lié par un pont disulfure. Chaque hétérodimère est composé d'une courte queue cytoplasmique C-terminale impliquée dans le transport intracellulaire (Weis et al. 2015), d'un domaine transmembranaire, de deux régions de répétition en heptade (HR) et d'un peptide de fusion hydrophobe (protéine membranaire de type 1) (Chan et al. 2012). Ces ensembles « tige-tête » s'organisent en trimère.

La protéine G (602 acides aminés) est aussi une glycoprotéine membranaire. Elle est responsable de l'attachement de NiV à ses récepteurs cellulaires. La protéine G ne présente ni activité d'hémagglutination (contrairement à MeV par exemple), ni activité neuraminidase (Eaton et al. 2006). Elle est composée d'une queue cytoplasmique N-terminale, d'un domaine transmembranaire, d'une tige et d'une tête globulaire extracellulaires (protéine membranaire de type 1I) (Bowden et al. 2008). Cet ensemble « tige-tête » s'organise en tétramère. Les récepteurs cellulaires de la protéine G sont les protéines membranaires Ephrines B2 et B3 (Xu et al. 2012). Les protéines Ephrines sont très conservées entre les espèces, ce qui explique le large éventail d'espèces infectables par NiV. Le schéma d'expression de Ephrines B2 et B3 correspond au tropisme cellulaire (neurones, cellules endothéliales et épithéliales, fibres de muscle lisse entourant les artères) et au tropisme d'organe (poumon, rate, rein, cerveau, placenta) de NiV. Les cellules dendritiques sont susceptibles à moindre échelle, tandis que les

lymphocytes et les monocytes ont été décrits comme non permissifs (Mathieu et al. 2011). Cependant, une dissémination de NiV dans l'organisme de l'hôte, médiée par le transport passif mais protecteur du NiV en surface des lymphocytes et d'autres cellules circulantes, est permise par une affinité de la protéine G pour les héparanes sulfates : on parle de transinfection (Mathieu et al. 2015).

La polymérase L (2244 acides aminés) de NiV n'a pas été particulièrement étudiée. Cependant, les ARN-polymérases ARN-dépendantes des *Mononegavirales* sont très conservées (Harcourt et al. 2001), ainsi que leurs fonctions enzymatiques, qui comprennent la synthèse d'ARN, la polyadénylation, l'ajout de coiffe et sa méthylation. Elles sont composées de 6 domaines fonctionnels (CR I à IV), dont les fonctions ont été déterminées. CR I permet la liaison à la phosphoprotéine P (Cevik et al. 2004), CR II permettrait la liaison de l'ARN (Smallwood et al. 1999), CR III permet la synthèse de l'ARN (Poch et al. 1989), CR IV aurait un rôle essentiellement structural (Rahmeh et al. 2010), CR V permet l'ajout de la coiffe (Ogino et al. 2010) et CR VI sa méthylation (Rahmeh et al. 2009). A noter que le motif GDNQ du CR III spécifique des *Mononegavirales* et essentiel à l'activité enzymatique (Sleat et al. 1993), diffère chez NiV en un motif GDNE sans différence fonctionnelle notable (Magoffin et al. 2007).

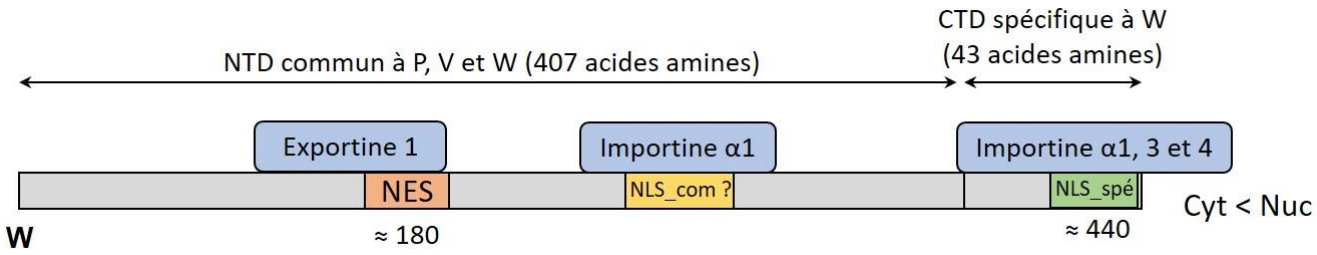


Figure 6 : *Résumé des différents sites d'import identifiés dans la protéine W et des partenaires qui leur sont associés (selon Rodriguez et al. 2004 ; Shaw et al. 2005 ; Audsley et al. 2016) : le NES du NTD (en rouge), le NLS du CTD (appelé NLS_spé, en vert) et le NLS commun mis en évidence, mais non localisé (appelé NLS_com, en jaune). Sa localisation dans cette figure est donc arbitraire. Les numéros correspondent à des positions de résidus.*

Les protéines V (456 acides aminés pour NiV-M et 459 acides aminés pour NiV-B après addition d'une seule guanine) et W (450 acides aminés après addition de 2 guanines) sont produites à partir d'ARNm édités issus du gène P (**Figure 5**). Elles possèdent donc un domaine N-terminal commun avec la protéine P correspondant à la région désordonnée, qui contient le site MoRE et un NES (Rodriguez et al. 2004). Le domaine C-terminal spécifique de V (49 acides aminés pour NiV-M et 52 pour NiV-B) est un motif en doigt de zinc très conservé chez les paramyxovirus (Ramachandran et al. 2009). Le domaine C-terminal spécifique de W (43 acides aminés) interagit avec les importines α1, α3 et α4. Un NLS a été identifié dans ce CTD (positions 439-442) (**Figure 6**). Son action est dominante à celle du NES situé dans le domaine N-terminal, expliquant la localisation nucléaire de W dans certaines cellules (Shaw et al. 2005

; Lo et al. 2010). La présence d'un autre NLS (à ce jour non localisé), situé dans le domaine N-terminal en commun à V et W interagissant avec l'importine α1 (Audsley et al. 2016), montre que le trafic cellulaire de ces protéines met en jeu plusieurs partenaires, qui en fonction de leur niveau d'expression dans les différents types cellulaires, pourraient avoir un impact sur les fonctions de ces protéines.

La protéine C (166 acides aminés) ne possède aucune séquence en commun avec les protéines P, V et W. Les protéines non structurales (PNS) V, W et C sont surtout décrites pour moduler la réponse immunitaire antivirale de l'hôte (cf. « II. LE CONTROLE DE LA REPONSE INNEE ANTIVIRALE PAR NiV »). La protéine C serait également impliquée dans le bourgeonnement de la particule virale de NiV grâce à un mécanisme dépendant de la voie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Park et al. 2016). En effet, C interagit à la fois avec la protéine de matrice M et avec le facteur TSG101 (Tumor susceptibility gene 101) de la voie ESCRT pour améliorer le bourgeonnement de la particule virale.

4. Organisation de la particule virale

La particule virale de NiV est assez similaire à celles d'autres paramyxovirus (**Figure 7B**). Du fait de son caractère pléomorphe (elle peut adopter des formes très différentes), sa taille est très variable (de 40 à 800 nm) (Hyatt et al. 2001). La particule virale contient le génome de NiV (ARN simple brin de polarité négative (3'-5') non segmenté). Cet ARN est entièrement encapsidé par la nucléoprotéine N (rapport de 1 N pour 6 nucléotides) formant ainsi la nucléocapside. La phosphoprotéine P et la polymérase L sont également associées à cette nucléocapside formant le complexe de transcription. Plusieurs nucléocapsides peuvent être intégrées dans une même particule virale. Les homotétramères d'attachement G et les homotrimères de fusion F sont incorporés à une membrane plasmique sous-tendue par la protéine de matrice M. Cette dernière permet la liaison entre la nucléocapside d'une part et la membrane plasmique d'autre part, grâce à une interaction avec le domaine N-terminal cytoplasmique de la protéine membranaire G.

E. Le cycle réplicatif

1. L'entrée de NiV dans la cellule hôte

La cascade de fusion de la membrane de NiV avec la membrane de la cellule hôte se décompose en trois grandes étapes (Aguilar et al. 2010). En l'absence de stimulus, les trimères d'hétérodimère mature F1 + F2 sont dans une forme métastable où les deux répétitions en heptade, l'une dite N terminale et l'autre C-terminale (i.e. HRN et HRC), sont associées. La liaison de la protéine d'attachement G avec les récepteurs d'entrée cellulaire Ephrine B2 ou Ephrine B3 déclenche des changements de conformation de la F (**Figure 7, A1**). Ainsi, les domaines HRN et HRC se déploient pour former un intermédiaire dit en « pré-épingle à cheveux ». Cette conformation permet l'exposition du peptide de fusion hydrophobe, qui vient s'enchâsser dans la membrane de la cellule hôte (**Figure 7, A2**). HRN et HRC se

réassocient pour former un faisceau de six hélices 6HB (Six Helix Bundle) plus stable, opérant ainsi un rapprochement et une fusion des membranes cellulaires et virales (**Figure 7, A3**). Bien que l'endocytose et la cathepsine L soient nécessaires à la maturation d'une protéine F fonctionnelle, une première étude a montré que le traitement des cellules VERO avec des inhibiteurs de l'endocytose (β-methyl-cyclodextrin et chlorpromazine) ne perturbe pas l'entrée de NiV dans les cellules Vero (Diederich et al. 2008), suggérant que l'endocytose n'est pas nécessaire à la fusion de la membrane cellulaire avec la membrane virale, à condition que celle-ci porte des protéines F fonctionnelles. Cependant, une autre étude a montré l'importance de la macropinocytose pour l'entrée de NiV dans les cellules VERO par l'utilisation de latrunculin A et d'amiloride (Pernet et al. 2009).

2. Transcription primaire, édition et gradient des ARNm viraux

La transcription des ARNm de NiV est décrite comme suivant des mécanismes similaires à celle des autres paramyxovirus (Noton et al. 2015). Après la fusion des membranes, le complexe de transcription de NiV est libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ce sont les protéines contenues dans la particule virale qui vont initier la transcription, dite transcription primaire. La polymérase L reconnait la séquence promotrice Leader en 3' et initie la transcription d'ARNm viraux directement à partir de l'ARN génomique simple brin de polarité négative (3'-5') (**Figure 7C**). Chaque gène est précédé d'une séquence non codante permettant l'ajout d'une coiffe (et sa méthylation) à l'ARNm qui va être transcrit. Chaque gène est également suivi d'une séquence non codante permettant l'ajout de la queue poly(A) à la fin du gène transcrit. Quand la polymérase arrive sur cette séquence non codante de polyadénylation, il y a alors trois possibilités :

- Dans ≈ 70% des cas, elle redémarre la transcription du gène suivant.
- Dans ≈ 20% des cas, elle arrête la transcription et doit donc réinitialiser la transcription au niveau de la séquence Leader.
- Dans ≈ 10% des cas, elle ignore la séquence de polyadénylation et continue la transcription du gène suivant sans discontinuité, formant ainsi un ARNm polycistronique dont seule la première séquence codante est traduisible.

De ce mécanisme résulte la formation d'un gradient d'ARNm. Plus un gène est éloigné de la séquence Leader, moins il est transcrit en ARNm. Comme pour MeV, la transcription de NiV nécessite la phosphorylation de la nucléoprotéine N (Huang et al. 2011).

A l'instar d'autres paramyxovirus, le gène P de NiV contient un site d'édition dont la séquence est AAUUUUUCC (Kolakofsky et al. 2005). Au niveau de cette séquence « glissante », jusqu'à 14 résidus guanines peuvent être ajoutés par la polymérase sur le brin néosynthétisé en plus des guanines présentes dans la séquence codante (Lo et al. 2009). Environ 67 % des transcrits sont édités pour NiV-M et environ 66 % pour NiV-B. Il en résulte un décalage du cadre de lecture lors de la traduction et la production des protéines V et W ayant des domaines C-terminaux spécifiques (cf. **Figure 5** et « I.D.2. Organisation du génome », dans cette partie).

3. Traduction des ARNm et transcription secondaire

La traduction des ARNm produits est assurée par les ribosomes cellulaires (**Figure 7**). Le gradient d'ARNm (**Figure 7C**) entraîne un gradient de protéines virales : la N étant la plus abondante et la L, la moins abondante. Les protéines V et W sont produites à partir des ARNm édités du gène P (**Figure 5**). Environ 50% des transcrits du gène P produisent la protéine P, environ 25% la V et environ 25% la W (Lo et al. 2009). A contrario, 100% des transcrits du gène P peuvent produire la protéine C, grâce au second codon alternatif d'initiation de la traduction situé amont du gène P. La production de nouvelles protéines virale, et notamment de polymérases L, entraîne la production de nouveaux complexes de transcription, qui vont pouvoir à leur tour initier une transcription, dite secondaire. Il en résulte une accumulation exponentielle des ARNm de NiV dans la cellule hôte.

4. Réplication du génome

Le mécanisme de réplication du génome de NiV est similaire à celui des autres paramyxovirus (Noton et al. 2015). La quantité de complexe N^0-P serait prépondérante à l'initiation de la réplication. Elle induirait une encapsidation simultanée de l'ARN produit, ce qui mettrait la polymérase dans un mode « super-processif » (**Figure 7D**). Ainsi, elle ne tiendrait plus compte des signaux intergéniques et allongerait l'ARN naissant sur la longueur complète du génome. La polymérase L initie la synthèse de l'ARN au niveau de la séquence promotrice Leader (au premier nucléotide précisément) et produit un ARN anti-génomique de sens positif (5'-3'). L'extrémité 3' de l'antigénome comprend une séquence complémentaire de la séquence Trailer, qui est un autre promoteur de la réplication (cf. **Figure 5** et « I.D.2. Organisation du génome », dans cette partie). Cette séquence permet d'initier à nouveau une réplication et de produire l'ARN génomique complémentaire de l'ARN anti-génomique. Les ARN génomiques et anti-génomiques sont encapsidés au fur-et-à mesure par la protéine N délivrée via le complexe N^0-P. Alors que les protéines N, P et L de NiV sont nécessaires et suffisantes pour la réplication du génome (Halpin et al. 2004), les protéines V, W et C ont été décrites pour inhiber la réplication (Sleeman et al. 2008).

5. Assemblage et bourgeonnement

La protéine de matrice M de NiV est l'élément central de l'assemblage de la particule virale et de son bourgeonnement (Watkinson et al. 2016). Grâce à ses interactions avec la protéine N et la protéine membranaire G, elle permet d'associer les nucléocapsides à la membrane cellulaire, où elles s'accumulent avec leurs complexes de transcription (**Figure 7**). La protéine M permet également le bourgeonnement de la particule virale grâce au détournement de la voie ESCRT. Bourgeonnement pour lequel les motifs tardifs YMYL (Ciancanelli et al. 2006) et YPLGVG (Patch et al. 2008) sont requis. La protéine C serait également impliquée dans ce mécanisme (Park et al. 2016). En effet, elle interagit à la fois avec la protéine M et avec le facteur Tsg101 de la voie ESCRT pour améliorer le bourgeonnement de la particule virale.

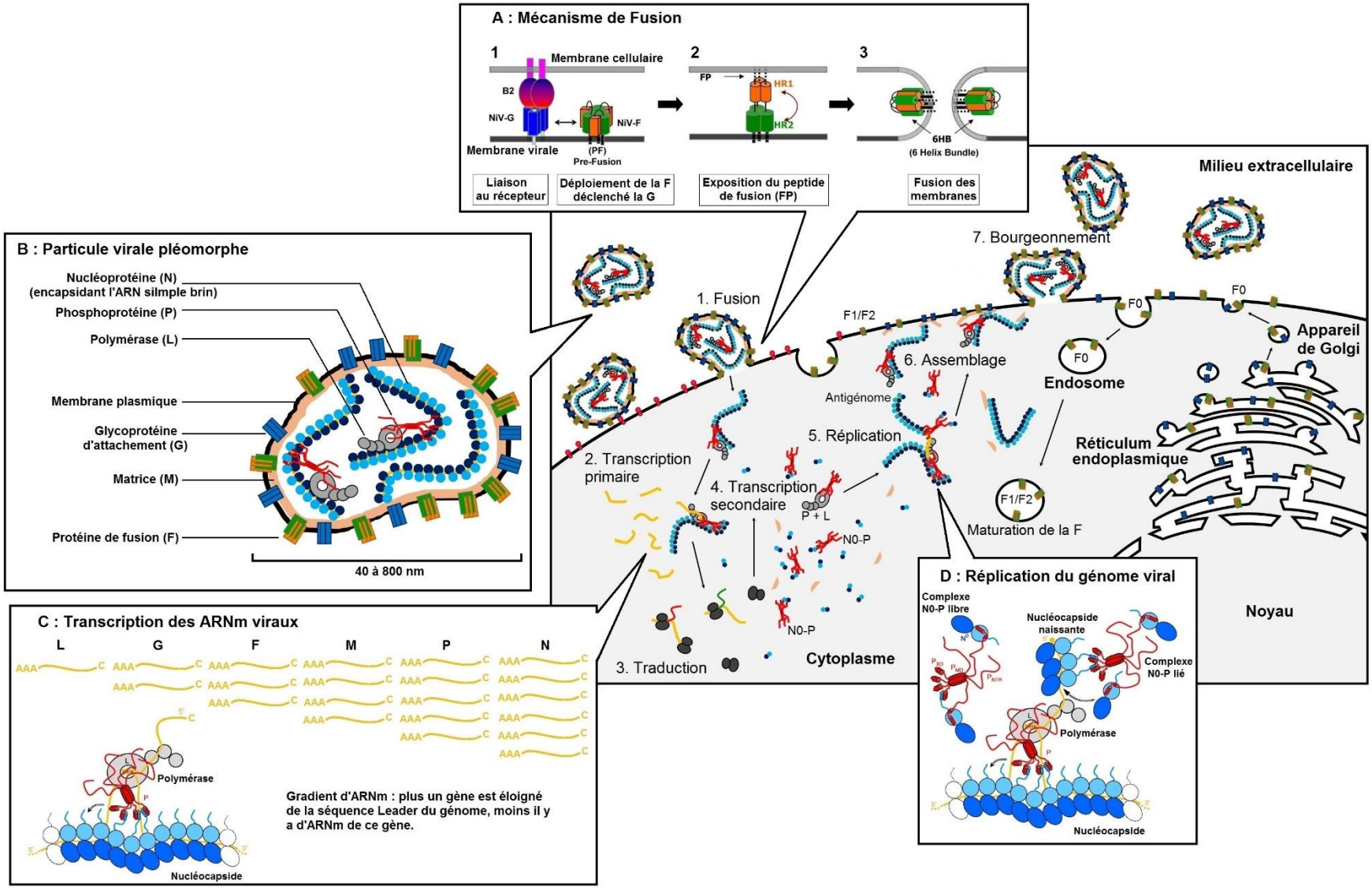


Figure 7 : *Représentation schématique du cycle viral de NiV (schéma adapté à partir de Aguilar et al. 2010 et de Yabukarski et al. 2014).* ***1 :*** *Après attachement aux récepteurs cellulaires Ephrine B2/B3, la membrane de la particule virale fusionne avec la membrane cellulaire, libérant le complexe de transcription.* ***2 :*** *Les ARNm viraux sont produits par la polymérase directement à partir du génome.* ***3 :*** *Les ARNm viraux sont traduits par les ribosomes de la cellule.* ***4 :*** *Les protéines nouvellement formées participent à la production de nouveaux ARNm à partir du génome viral.* ***5 :*** *Lorsque la quantité de N0-P est suffisante, la polymérase initie la réplication du génome en anti-génome, puis de l'anti-génome en génome.* ***6 :*** *La protéine de matrice M permet l'assemblage à la membrane des différents composants de la particule virale avant le bourgeonnement et la libération des nouveaux virions (**7**). Miniatures =* ***A :*** *Représentation schématique du mécanisme de fusion.* ***B :*** *Représentation schématique de la particule virale de NiV.* ***C :*** *Représentation schématique de la transcription et de l'élaboration du gradient d'ARNm viraux.* ***D :*** *Représentation schématique de la réplication du génome viral.*

II. LE CONTROLE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ANTIVIRALE PAR NiV

A. Mise en place de l'immunité antivirale

1. Déclenchement de l'immunité innée par les virus à ARN

Les cellules possèdent de nombreux senseurs leur permettant de détecter des motifs conservés parmi les agents pathogènes, appelés PAMPS (Pathogen-Associated Molecular Patterns). La détection de PAMPs permet le déclenchement de voies de signalisation aboutissant à la transcription de gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée. Le déclenchement de l'immunité innée permet à la cellule de mettre rapidement en place des défenses appropriées contre le pathogène détecté et de mettre en place les premières étapes de l'immunité adaptative. Ainsi, lors d'une infection virale, de nombreuses cytokines sont produites par les cellules afin de transmettre le signal d'alarme. Parmi elles, les interférons de types I α et β (IFNα/β) sont produits localement pour induire un état de défense antivirale chez la cellule infectée et les cellules voisines.

Les virus à ARN peuvent être détectés par deux familles de récepteurs cellulaires : les récepteurs membranaires de type Toll (TLRs) et les récepteurs cytoplasmiques de type RIG (RLRs). Les TLR3 et TLR7/8 peuvent détecter respectivement les ARNs double et simple brin dans le milieu extracellulaire (**Figure 8**) (S.-Y. Zhang et al. 2007). L'engagement des TLR3 et TLR7/8 par leur ligand active leurs transducteurs de signal, TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ) et MyD88 respectivement (Myeloid Differentiation primary-response protein 88) pour déclencher la cascade de signalisation via TRAF3 (TNF Receptor-Associated Factor 3) aboutissant à la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (Interferon-Regulatory Factors 3 and 7) par différentes kinases. Les RLRs MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) et RIG-I (Retinoic-acid Inducible Gene 1) peuvent détecter les ARN viraux dans le cytoplasme (**Figure 8**) : RIG-I détecte préférentiellement les courts ARN double brin (7 à 10 pb) 5'-triphosphates et MDA5 détecte préférentiellement les longs ARN double brin (> 2000 pb) sans mésappariement (Lässig et Hopfner 2017). Les ARN DI (Defective Interfering RNA) de forme « hairpin » ou « panhandle » produits pendant le cycle viral sont décrits pour être des ligands de choix de RIG-I et donc pour favoriser la détection des paramyxovirus par les RLRs (Schlee et Hartmann 2010). Ces DI pouvant être présents en grande quantité dans les particules virales ayant de nombreux passages sur cellules *in vitro*, ils posent le problème du contrôle des stocks de virus utilisés pour l'étude des mécanismes d'activation des voies cellulaires (Shivakoti et al. 2013). La technique de génétique inverse peut remédier au problème des DI dans les stocks viraux, mais au détriment du polymorphisme des stocks. RIG-I et MDA5 possèdent des domaines CARD (Caspase Activation and Recruitment Domains), qui interagissent avec une plateforme mitochondriale MAVS (Mitochondrial Antiviral-Signaling protein) lorsque RIG-I et MDA5 détectent leurs ligands. Un troisième RLR, LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2),

dépourvu de domaine CARD, peut reconnaître des ARN double brin à bouts francs coiffés ou non (Lässig et Hopfner 2017). LGP2 a initialement été décrit comme un régulateur des RLRs (Bruns et al. 2015) : surexprimé dans des cellules, il présente un effet inhibiteur des RLRs, mais quand il est présent à de faibles concentrations dans la cellule, il a un effet synergique de l'activation de MDA5. Des données plus récentes étayent l'effet synergique de LGP2 sur MDA5 (Uchikawa et al. 2016), mais il n'aurait pas de réel effet inhibiteur (Lässig et Hopfner 2017). Il serait simplement en compétition pour les mêmes ligands que RIG-I. L'activation de MAVS par les RLRs déclenche la cascade de signalisation via TRAF3, aboutissant à la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7. La phosphorylation des IRFs permet leur dimérisation et leur translocation nucléaire. La phosphorylation d'IRF3 par IKKε (IκB Kinase ε) et TBK1 (Tank-Binding Kinase 1) permet la formation d'hétérodimères IRF3/IRF7 responsables de la production d'IFNβ. Dans un second temps, le déclenchement de la voie permet une production d'IRF7 qui, présent en plus grande quantité dans la cellule et phosphorylé par IKKα, permet la formation d'homodimères IRF7/IRF7 responsables de la production d'IFNα. A noter que la production constitutive d'IRF7 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes permet la production d'IFNα dès les premiers temps d'activation de la voie (Izaguirre et al. 2003).

2. Réponse à l'IFN de type 1 et mise en place des défenses antivirales

L'IFN de type 1 produit est libéré dans le milieu extracellulaire et se fixe sur l'hétérodimère IFNAR 1/2 (IFNα/β Receptor 1 et 2) des cellules avoisinantes (**Figure 9**) (Ivashkiv et al. 2014). L'engagement d'IFNAR entraîne la phosphorylation du récepteur par JAK1 (Janus Kinase 1) et TYK2 (Tyrosine Kinase 2) permettant le recrutement de deux transducteurs de signal STAT 1 et 2 (Signal Transducers and Activators of Transcription 1 and 2). A leur tour, STAT 1 et 2 vont être phosphorylés par JAK1 et TYK2 et s'associer en hétérodimère. Cet hétérodimère se lie à IRF9, entre dans le noyau et déclenche la transcription de centaines d'ISGs (IFN-Stimulated Genes), dont les fonctions de certains sont encore mal définies (Schoggins et al. 2011). Parmi ces fonctions, les ISGs permettent la production de différentes protéines antivirales. Par exemple, la PKR (Protein Kinase RNA-activated) inhibe la traduction des ARNm et donc des messagers viraux.

Les paramyxovirus ont développé différentes stratégies pour échapper aux défenses antivirales. Chez les chauves-souris de la famille des *Pteropodidae*, les voies de l'immunité innée décrites ci-dessus sont fonctionnelles (Enchéry et Horvat 2017), ce qui a permis le maintien des mécanismes d'évasion communs aux paramyxovirus, mais a aussi permis le développement de mécanismes inédits spécifiques de l'immunité des chauves-souris.

B. Effets des protéines de NiV sur la production de l'IFN

1. Effet de la protéine V sur MDA5 et LGP2

La protéine V de NiV exprimée après transfection inhibe l'activation du gène de l'IFNβ dans des cellules VERO activées avec MDA5 (Childs et al. 2007). Le motif en doigt de zinc du

domaine C-terminal de la protéine V de NiV, très conservé chez les paramyxovirus, lie MDA5 (Childs et al. 2007) et LGP2 (Parisien et al. 2009) (**Figure 8**), mais pas RIG-I. Les acides aminés R806 de MDA5 et R455 de LGP2 sont nécessaires pour la reconnaissance par NiV V (Rodriguez et al. 2013). La mutation R806L de MDA5, qui empêche la liaison avec V, abroge l'inhibition de la production d'IFNβ. En effet, l'interaction de V avec MDA5 et LGP2 perturbe la fonction d'hydrolyse de l'ATP de ces deux protéines, qui est nécessaire à MDA5 pour activer MAVS et à LGP2 pour co-activer MDA5. A noter que la substitution L714R dans RIG-I rend le récepteur susceptible au blocage par la protéine V. La structure de la V de PIV5 (Parainfluenza Virus 5) en complexe avec MDA5 fournit les bases moléculaires du blocage de la fonction de MDA5 (Motz et al. 2013). Par cette interaction, la protéine V déplace le site ATPase de MDA5, ce qui entraîne la perturbation de son activité d'hydrolyse de l'ATP.

2. Effets des protéines V et W sur IRF3

La protéine W de NiV inhibe l'activation du gène de l'IFNβ dans des cellules HEK293T infectées par SeV (Shaw et al. 2005). Le même effet est observé dans les cellules activées avec TLR3 et TRIF (**Figure 8**). Cet effet inhibiteur s'accompagne d'une diminution de la phosphorylation d'IRF3 quand la quantité de W augmente. La transfection d'un plasmide codant pour une protéine W, dont le NLS a été muté, perd cette capacité inhibitrice, alors que cette même protéine, couplée avec le NLS de l'antigène T de SV40 (Simian virus 40) afin de restaurer sa localisation nucléaire, retrouve cette fonction. La localisation nucléaire de W est donc nécessaire à l'inhibition de la voie de signalisation de TLR3. De façon intéressante, le NLS d'IRF3 présente une interaction avec les kariophérines α3 et α4, avec lesquelles W a une affinité marquée (Shaw et al. 2005).

La protéine V de NiV couplée avec le NLS de l'antigène T de SV40 acquiert elle aussi la capacité d'inhiber TLR3 (M. L. Shaw et al. 2005). Mais cette inhibition n'a lieu que sous l'activation par IKKε (contrairement à W qui inhibe la voie de TLR3 activée à la fois par IKKε et par TBK1) et ne s'accompagne pas d'une déphosphorylation d'IRF3. Ces données suggèrent qu'au moins une partie de cet effet inhibiteur de TLR3, partagé par V et W, serait due à leur domaine N-terminal en commun et nécessiterait une localisation nucléaire des protéines. L'importance de la localisation nucléaire de W de NiV pour inhiber la réponse immunitaire innée a également été rapportée en contexte infectieux (Lo et al. 2010). En effet, les cellules endothéliales HULEC, LYMEC et HUVEC infectées par NiV, dans lesquelles la protéine W serait localisée dans le cytoplasme, produisent de l'IFNβ, contrairement aux cellules neuronales M17 dans lesquelles W est nucléaire. De plus, la réplication de NiV dans les cellules neuronales est significativement plus importante que celle dans les cellules endothéliales.

L'interaction de la protéine V avec les IRFs a été décrite pour de nombreux paramyxovirus, parfois dans des études contradictoires. En effet, la V de MeV interagirait avec IRF7 en plus d'interagir avec IKKα, mais pas avec IRF3 (Pfaller et al. 2008). Cependant, dans une autre étude, les V de SeV, MeV et NDV (Newcastle Disease virus), mais pas celle de NiV,

interagiraient avec IRF3 et inhiberaient son activation (Irie et al. 2012). Dans ce même contexte, une interaction avec RIG-I a également été observée pour l'ensemble des V de SeV, MeV, NDV, MuV (Mumps virus) et NiV, alors qu'une telle interaction avait été précédemment écartée (Childs et al. 2007) et est exclue par les données structurales (Motz et al. 2013). Cette interaction inattendue a été mise sur le compte de la surexpression des protéines V, mais questionne la validité de toutes les autres interactions décrites en conditions de surexpression. Ainsi, l'expérimentation en contexte infectieux est indispensable pour valider la réalité physiologique de ces effets.

3. Effet de la protéine C sur IKKα

La protéine C de NiV inhibe l'activation du gène de l'IFNα dans des cellules HEK293T (Human Embryonic Kidney 293 SV40 T antigen) activées avec MyD88/TRAF6/IKKα/IRF7 (Yamaguchi et al. 2014). La protéine C interagit avec IKKα l'empêchant ainsi de phosphoryler IRF7 (**Figure 8**). IRF7 ne peut donc pas entrer dans le noyau pour y jouer son rôle de facteur de transcription. Cette fonction de la C semble partagée par plusieurs paramyxovirus : le virus Sendai (SeV), PIV3 et MeV. Les protéines C de NiV et MeV sont homologues (Lo et al. 2014), mais elles ne partagent aucune similarité de séquence avec la protéine C de SeV. Malgré tout, elles auraient toutes trois une origine commune du fait de leur organisation similaire et de leur localisation sur le gène P. Cette fonction inhibitrice d'IKKα des protéines C serait donc conservée parmi les paramyxovirus, sans conservation de séquence. De façon intéressante, un effet similaire de la protéine V de MeV avait été décrit précédemment (Pfaller et al. 2008). Les protéines C et V de MeV aurait donc une action redondante sur IKKα. Une régulation de la production de cytokines par la protéine C de NiV a également été mise en évidence sans que le mécanisme sous-jacent soit détaillé (Mathieu et al. 2012). En effet, une étude transcriptomique comparant des cellules infectées par NiV et par NiVΔC (n'exprimant pas la protéine C) a identifié tout un ensemble de cytokines dont l'expression est inhibée en présence de C : IL-1β (Interleukin-1β), IL-8, CXCL2 (C-X-C motif Ligand 2), CXCL3, CXCL6, CCL20 (C-C motif Ligand 20) et IFNβ. Les facteurs de transcription STAT et NF-κB (Nuclear Factor-Kappa B) étant nécessaires à la production de ces cytokines, C pourrait perturber leurs voies de signalisation respectives.

4. Effet de la protéine structurale M sur TRIM6

Un effet inhibiteur de la production d'interféron par la protéine structurale de matrice M a récemment été décrit (Bharaj et al. 2016). En effet, la protéine M de NiV inhibe l'activation du gène de l'IFNβ dans des cellules HEK293T activées avec TRIF, MAVS, TBK1 ou encore IKKε, mais pas avec IRF3. Le même effet est observé dans les cellules infectées. La protéine M de NiV interagit avec TRIM6 (Tripartite Motif protein 6) afin d'induire sa dégradation par un mécanisme indépendant du protéasome. TRIM6 étant responsable de la formation de la chaîne de polyubiquitines non ancrée nécessaire à l'activation d'IKKε, sa dégradation par M induit l'inactivation des voies passant par IKKε (**Figure 8**). Cet effet nécessite l'acide aminé

K258 de M, conservé chez HeV, GhV et CeV, comme est conservée cette fonction de M. Le rôle de M dans la dégradation de TRIM6 a été confirmé en contexte d'infection, sans que son rôle dans l'effet global d'inhibition de la voie n'ait été mis en évidence. L'inhibition par M de la voie activée par TBK1 n'a pas été plus détaillée. Ces résultats montrent que les protéines structurales ne sont pas seulement cantonnées à un rôle de structure de la particule infectieuse, à l'instar des PNS qui ne doivent pas être réduites à des rôles de modulateurs de la réponse immunitaire (Park et al. 2016).

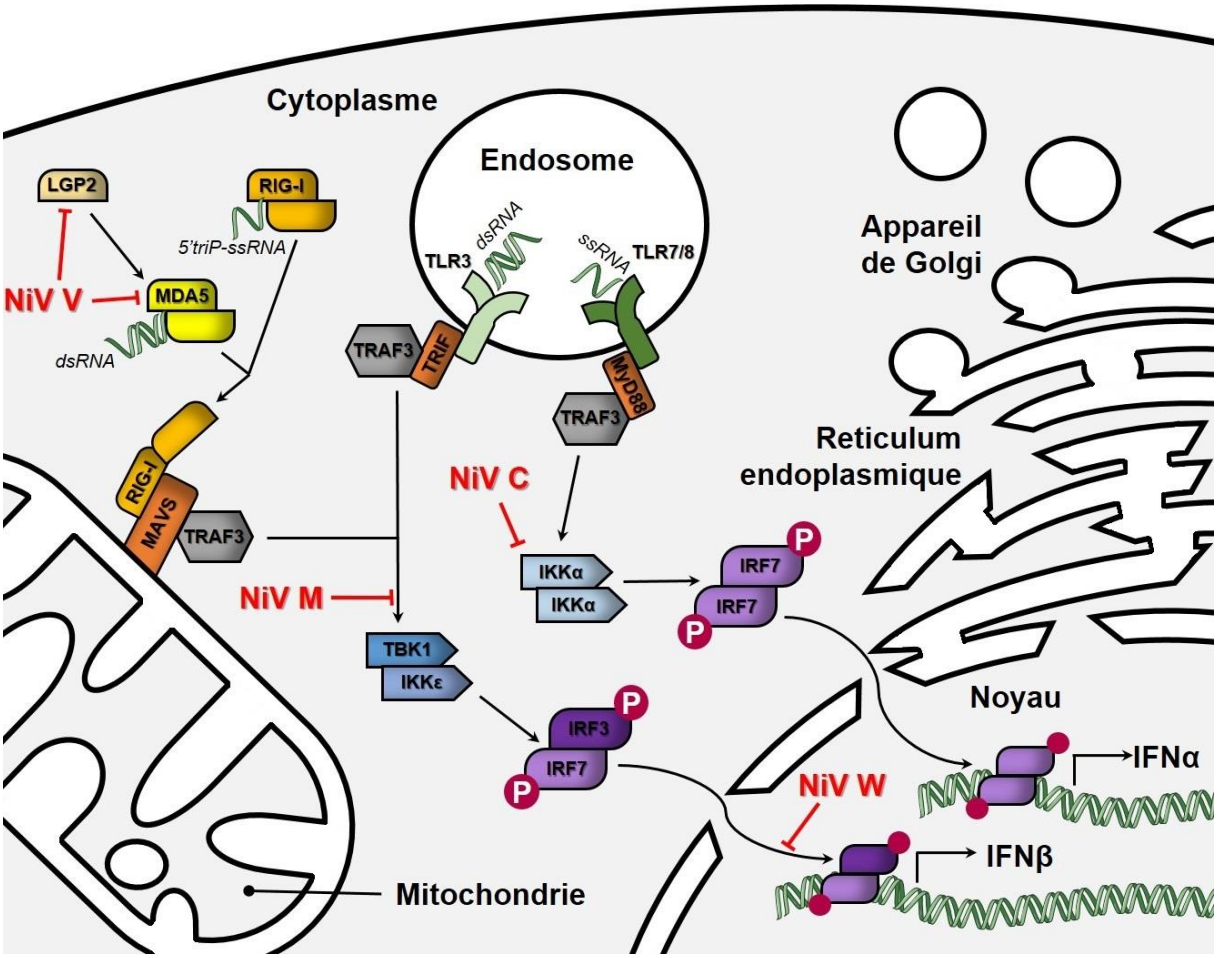


Figure 8 : *Représentation schématique de la voie de production de l'interféron de type 1 déclenchée par les RLRs et les TLRs, et de son inhibition par les protéines de NiV. La protéine V interagit avec MDA5 et LGP2 inhibant ainsi l'activation de la plateforme MAVS. La protéine C interagit avec IKKα l'empêchant de phosphoryler IRF7. La protéine M interagit avec TRIM6 entraînant sa dégradation, ce qui inhibe l'activation d'IKKε. La protéine W entraîne une déphosphorylation d'IRF3 dans le noyau.*

C. Effet commun de P, V et W sur la réponse à l'IFN

La protéine V de NiV inhibe la cascade de signalisation de l'IFN de type 1 dans des cellules 2FTGH stimulées avec de l'IFNα (Rodriguez et al. 2002). En effet, V interagit avec STAT 1 et 2 sans induire leur dégradation (**Figure 9**). Cette interaction entraîne une redistribution

cytoplasmique des STATs par un mécanisme d'export nucléaire dépendant de CRM1 (Chromosomal Maintenance 1), où les complexes de haut poids moléculaire V/STAT s'accumulent. La formation de ces complexes empêche la phosphorylation de la T701 de STAT1, nécessaire à son activation. De façon similaire, la protéine V inhibe la cascade de signalisation de l'IFN de type 3 dans des cellules 2FTGH stimulées avec de l'IFNγ. Le NES dépendant de CRM1 de V a été localisé entre les acides aminés 174 and 192 (Rodriguez et al. 2004). Il est nécessaire à la rétention de STAT 1 et 2 dans le cytoplasme, mais n'est pas nécessaire à l'inhibition de la voie de signalisation de l'IFN. L'interaction de V avec STAT1 est nécessaire à l'interaction avec STAT2. La région de la V située entre les acides aminés 100 et 160 interagit avec celle de STAT1 comprise entre les acides aminés 509 à 712. Ce site d'interaction de V est chevauché par le site d'interaction avec la PLK1 (Polo-Like Kinase 1), responsable de la phosphorylation de V (Ludlow et al. 2008). Mais les interactions de V avec PLK1 et STAT1 sont indépendantes l'une de l'autre. La région de V permettant l'interaction avec STAT2 est comprise entre les acides aminés 100 à 300, avec un rôle prépondérant des résidus 230 à 237 dont la délétion diminue grandement cette interaction. Cette capacité de la V de NiV à bloquer la voie de signalisation de l'interféron a été retrouvée dans les cellules de sept espèces : Homme, singe vert d'Afrique, lapin, chien, cheval, porc et une espèce de chauve-souris insectivore *Tadarida brasiliensis* (Hagmaier et al. 2006).

Les protéines P et W de NiV ayant les 407 premiers acides aminés N-terminaux en commun avec la protéine V interagissent également avec STAT1 (Shaw et al. 2004). Mais alors que P, comme V, séquestre STAT1 dans le cytoplasme, la protéine W du fait de sa localisation nucléaire séquestre STAT1 dans le noyau (**Figure 9**). P et W inhibe aussi la phosphorylation de la T701 de STAT1 et donc son activation, mais l'effet inhibiteur de P serait plus faible que celui de W et V. Les mutations des acides aminés G121E, G125E, G127E, et Y116E dans la P entraînent son incapacité à bloquer la voie de signalisation de l'IFN (Ciancanelli et al. 2009). De façon intéressante, la mutation G125E a été découverte dans un virus isolé chez un patient humain (Hagmaier et al. 2006). Cela suggère que la capacité des produits du gène P à inhiber la réponse à l'IFN n'est pas nécessaire à NiV pour passer la barrière d'espèce chez l'Homme. Récemment, il a également été suggéré que la protéine N de NiV joue un rôle dans l'inhibition de la voie Jack/STAT (Sugai et al. 2017).

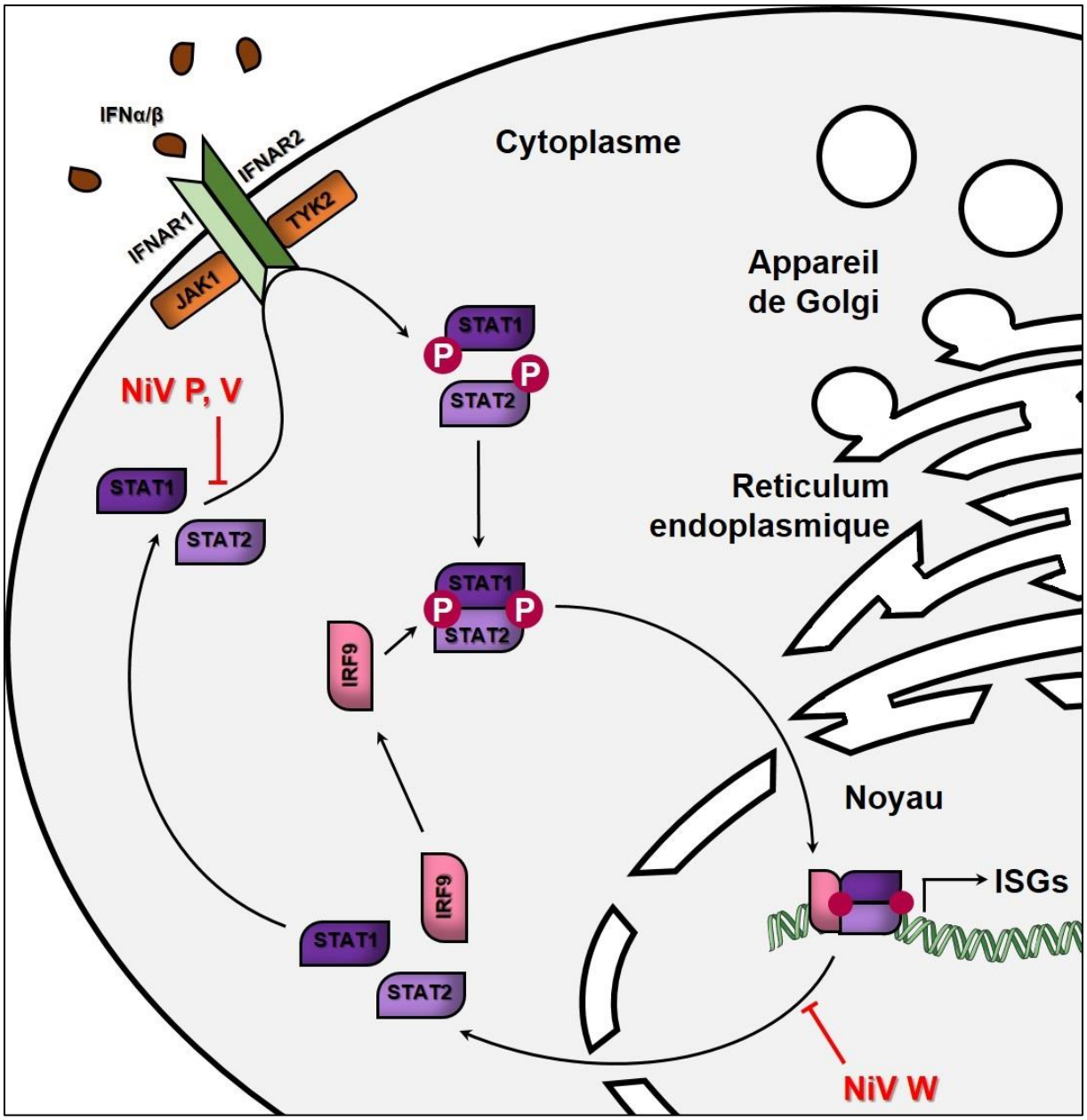


Figure 9 : *Représentation schématique de la voie de réponse à l'interféron de type 1 et de son inhibition par les protéines de NiV. Grâce à leur domaine N-terminal en commun, P, V et W interagissent avec STAT1 et inhibent sa phosphorylation. P et V séquestrent STAT1 dans le cytoplasme et la protéine nucléaire W la séquestre dans le noyau. La V présente également une interaction avec STAT2, qui nécessite une interaction préalable avec STAT1.*

D. Effets des protéines non structurales de NiV sur la réponse immunitaire innée en contexte infectieux

1. Importance et limites de l'étude des protéines non structurales en contexte infectieux

En contexte de transfection, les protéines non structurales (PNS) V, W et C de NiV sont toutes décrites pour inhiber la production d'IFN de type 1 (**Figure 8**). V et W (et P, du fait du

leur domaine N-terminal en commun) sont aussi impliquées dans l'inhibition de la réponse à l'IFN (**Figure 9**). La liste de ces effets n'est probablement pas exhaustive et d'autres partenaires cellulaires des protéines virales pourraient être impliqués dans des mécanismes encore mal connus. Bien que certains résultats présentés précédemment aient été obtenus lors d'une infection par NiV, la plupart des effets des PNS a été étudiée à l'aide de la transfection d'un plasmide codant une seule protéine. Cette méthode d'exploration a de nombreux avantages, particulièrement dans l'étude d'un pathogène de classe 4. Mais elle présente également de nombreux biais du fait de la surexpression de la protéine exprimée suite à la transfection, de l'absence du contexte protéique viral et du fait d'un contexte cellulaire certainement différent de celui d'une cellule infectée. En effet, la quantité de protéines virales (Virtue et al. 2011a), leur production séquentielle dans le cycle (Kulkarni et al. 2009) et leurs interactions entre elles sont des facteurs déterminants de la réelle importance des effets décrits en contexte de transfection. Pour preuve, une étude des interactions cellulaires de la protéine V de MeV a identifié 245 interactions en contexte d'infection virale, alors que parmi celles-ci seulement 142 ont été retrouvées en contexte de transfection (Komarova et al. 2011). Ainsi la validation en contexte infectieux de données obtenues par transfection est indispensable pour justifier de leur validité.

Les résultats en contexte infectieux présentent eux aussi un certain nombre de biais et de difficultés dans leur interprétation. Par exemple, l'utilisation de virus recombinants déficients pour une ou plusieurs protéines permet de supprimer les effets directs de ces protéines sur leurs partenaires cellulaires dans un contexte infectieux. Mais cela supprime également l'influence de ces protéines sur les effets des protéines virales toujours exprimées et perturbe globalement le cycle viral. Par exemple, les protéines V, W et C de NiV ayant un effet inhibiteur sur la réplication d'un minigénome (Sleeman et al. 2008), la suppression d'une ou plusieurs de ces protéines aboutit nécessairement à un virus recombinant ayant une réplication altérée par rapport à un virus WT (Wild-Type). L'appréciation de l'implication de tous ces effets « secondaires » dans l'effet principalement étudié est une part non négligeable de l'interprétation des résultats. Enfin, la multiplicité des types cellulaires utilisés, des temps d'infection, des méthodes d'exploration et des MOI (Multiplicity Of Infection) employés dans les différentes études représentent une série de biais potentiels rendant difficile la définition du rôle exact des PNS en contexte infectieux.

Face aux exigences de biosécurité rencontrées pour étudier les PNS de NiV (pathogène de classe 4) en contexte infectieux, diverses stratégies ont été élaborées pour s'en affranchir. Par exemple, des NDV recombinants exprimant soit la protéine V, soit la protéine W de NiV, ont été utilisés pour étudier les effets inhibiteurs de la réponse antivirale de ces proteines en contexte infectieux (Glennon et al. 2015). Notamment, des cellules PVK4 de rein de *Pteropus vampyrus* ont été infectées avec ces virus recombinants. Cellules dans lesquelles il avait été préalablement démontré que NDV induisait une forte réponse antivirale. Bien que les protéines V et W aient ainsi été produites par un virus dans un contexte d'infection, on peut s'interroger sur la pertinence de résultats obtenus dans des cellules de chauves-souris

infectées par un virus aviaire exprimant une seule des protéines de NiV grâce à un cadre de lecture supplémentaire dans le génome de NDV (c'est-à-dire sans avoir recourt à un mécanisme d'édition).

2. Effets des protéines non structurales sur la production des cytokines en contexte infectieux *in vitro*

Dans un premier temps, des études ont porté sur la recherche d'un effet inhibiteur global de l'infection par NIV sur la production d'IFN de type 1. Alors que des cellules HEp-2 stimulées par du poly I:C montrent une forte activation de la production d'IFN, la production d'ARNm des IFNα et β semblerait limitée dans celles infectées par NiV à MOI 10, 3h après infection (Virtue et al. 2011a). Dans les mêmes conditions, la production d'IFN est également peu ou pas activée dans des cellules PaLuT02 de chauves-souris infectées par NiV par rapport aux cellules stimulées avec du poly I:C (Virtue et al. 2011b). Dans cette étude, l'effet de l'infection virale sur la production d'IFN stimulée par du poly I:C n'a pas été testé. A ce moment précoce du cycle viral (3h après infection), le virus est dans la phase de transcription, mais vraisemblablement pas dans la phase de réplication du génome. Il est ainsi difficile de déterminer si l'infection par NiV n'a pas déclenché la production d'IFN de type 1 (du fait du peu d'ARN viraux produits) ou si cette production est inhibée par les protéines V, W, C et/ou M. En effet, les protéines non structurales V et W ne s'accumulent que tardivement dans la cellule, avec un maximum entre 10h et 24h après infection (Kulkarni et al. 2009). Contrairement à l'IFNβ, l'IFNα serait produit de façon constitutive dans les cellules PaKiT03 de chauves-souris avec des niveaux de production d'ARNm plus élevés dans certains organes (cerveau et poumon par exemple) (Zhou et al. 2016), sans que cela ait été préalablement rapporté par Virtue et al. en 2011. Cette production constitutive d'IFNα est insensible aux effets antagonistes de l'infection par HeV de cellules PaKiT03. Cette production constitutive d'IFNα serait une explication du portage asymptomatique de nombreux virus par les chauves-souris.

L'utilisation de virus recombinants déficients pour les différentes PNS a permis d'essayer de discriminer les rôles de chacune. Il n'y a pas de différence de production d'IFNβ 12h après infection (MOI 5) entre des virus NiV déficients pour les domaines C-terminaux des protéines V ou W et le virus WT dans des cellules HMVEC-L, alors qu'une augmentation relative est observée pour les virus déficients pour la protéine C ou pour le mécanisme d'édition (c'est-à-dire déficient à la fois pour V et W) (Lo et al. 2012) (**Tableau 2**). Cependant, 24 et 48h après infection, les virus dépourvus de V, W ou de C ou du mécanisme d'édition induisent tous une augmentation significative de la production d'IFNβ par rapport à une infection avec le virus WT. Ces résultats seraient en faveur d'un contrôle précoce (12h après infection) de la réponse antivirale par la protéine C (en accord avec les données obtenues par ailleurs (Mathieu et al. 2012)), alors que les effets inhibiteurs des domaines C-terminaux de V et W seraient plus tardifs (24 - 48h après infection). Cette conclusion est également en accord avec les résultats présentant une production tardive des protéines V et W (Kulkarni et al.

2009), alors que la protéine C est potentiellement produite dès le début de la transcription du gène P (**Figure 5**). Bien qu'un mécanisme d'inhibition de la production d'IFNα par C ait déjà été décrit (Yamaguchi et al. 2014), des études complémentaires sont nécessaires pour mettre en évidence le mécanisme direct de contrôle précoce des défenses antivirales par la protéine C.

Tableau 2 : *Résumé des effets des produits du gènes P lors d'une infection de cellules HMVEC-L à MOI 5 infectées par différents virus recombinants en comparaison au virus WT d'après Lo et al. 2012. C ko = virus n'exprimant pas la protéine C ; V(CTD) ko = virus n'exprimant pas le domaine C-terminal de la protéine V ; W(CTD) ko = virus n'exprimant pas le domaine C-terminal de la protéine W ; V/W ko = virus n'exprimant pas les protéines V et W ; C/V/W ko = virus n'exprimant pas les protéines C, V et W ; STAT = virus portant la mutation ponctuelle G125E abolissant l'interaction des protéines P, V et W avec STAT1 (Ciancanelli et al. 2009). « Edition des ARNs » correspond au pourcentage des ARNm édités par rapport au nombre total d'ARNm du gène P 24h après infection, « Réplication » correspond au nombre de copies du génome de NiV 12h après infection, « Titre » correspond au titre maximal, « ISGs » correspond à la transcription d'un ensemble de gènes anti-viraux, « IFNβ » correspond à la production d'IFNβ dans le milieu. P = précoce et T = tardif. « + » (ou « ++ ») indique une augmentation (ou forte augmentation) par rapport au virus sauvage, « - » (ou « - - ») indique une diminution (ou forte diminution) par rapport au virus sauvage et = indique un niveau similaire au virus sauvage.*

Virus	Edition des ARNs	Réplication	Titre	ISGs	IFNβ	
					P	T
C ko	=	+	- -	++	++	+
V(CTD) ko	-	- -	- -	+	=	+
W(CTD) ko	=	=	=	=	=	++
V/W ko	- -	+	-	++	++	++
C/V/W ko	- -	+	- -	++	++	+
STAT	=	=	=	++	=	=

Cette production augmentée d'IFNβ en absence de C n'est certainement pas uniquement due à un effet inhibiteur direct de la protéine sur la voie de production de l'IFNβ. En effet, la protéine C inhibe la réplication du génome, au même titre que les protéines V, W et leur domaine N-terminal en commun (Sleeman et al. 2008). Et de façon intéressante, les lignes du **tableau 2** indiquant une forte production d'IFNβ (C ko, V/W ko et C/V/W ko) sont aussi les lignes où la réplication du génome est augmentée. Si la réplication augmente, le nombre d'ARNs viraux dans la cellule augmente, favorisant ainsi la détection par les RLRs et la production d'IFN. La protéine C pourrait donc limiter la réponse antivirale en limitant la production d'ARNs viraux au même titre que les protéines V et W (correspondant aux lignes V/W ko et C/V/W ko du **tableau 2**). Le rôle possible de la protéine C dans la limitation de la production de DI serait également une explication à l'augmentation de l'IFNβ en son absence (Pfaller et al. 2015). A contrario, l'augmentation de la production tardive d'IFNβ dans le cas de l'infection par les virus V(CTD) ko et W(CTD) ko n'est pas associée à une augmentation de la

réplication. En effet, ces virus produisent une protéine chimère correspondant au domaine N-terminal commun à V et W, qui est décrite pour inhiber la réplication du génome (Sleeman et al. 2008), en plus de produire la protéine C, la V (pour le W(CTD) ko) ou la W (pour le V(CTD) ko. L'augmentation de la production tardive d'IFNβ en l'absence de V(CTD) et de W(CTD) pourrait donc bien correspondre à l'absence de l'effet inhibiteur que ces protéines exercent via leurs domaines C-terminaux respectifs directement sur la voie de production d'IFNβ (Shaw et al. 2005 ; Childs et al. 2007).

Le contrôle de la réponse antivirale par la protéine W dépendrait du type cellulaire (Lo et al. 2010). Des cellules endothéliales HULEC, LYMEC et HUVEC infectées par NiV présentent une production d'IFNβ à partir de 16h après infection, avec une augmentation significative 24h après infection, contrairement à des cellules neuronales M17. Cette production d'IFNβ dans les cellules endothéliales s'accompagne d'une production des chimiokines IL-8, CXCL10 et CCL2, et d'un chimiotactisme des monocytes et lymphocytes T. Il est possible que cet effet différentiel résulte d'une localisation cytoplasmique de W et non nucléaire dans les cellules endothéliales HULEC, LYMEC et HUVEC. Le mécanisme d'inhibition de la voie TLR3 par W ayant été décrit comme dépendant de sa localisation nucléaire (Shaw et al. 2005), l'hypothèse d'une production plus importante de cytokines dans les cellules endothéliales infectées par NiV du fait de la localisation cytoplasmique de W, par rapport aux cellules neuronales M17, a été avancée. Cependant, les cellules endothéliales HMVEC-L (correspondant aux cellules HULEC d'après Lo et al. 2012) infectées par un virus NiV déficients pour le domaine C-terminal de la protéine W présentent une production tardive d'IFNβ plus importante que les HMVEC-L infectées avec le virus WT (Lo et al. 2012). De plus, les HMVEC-L infectées par un virus NiV déficient pour le mécanisme d'édition (c'est-à-dire déficient à la fois pour V et W) montre une production précoce et tardive d'IFNβ et de chimiokines plus importante par rapport au virus WT, sans que cela puisse être uniquement expliqué par l'absence de protéine V. Ainsi, les différences phénotypiques observées entre absence de W et localisation cytoplasmique de W suggèrent que la localisation de cette protéine est un paramètre fonctionnel.

3. Effets des protéines non structurales sur la réponse à l'interféron en contexte infectieux *in vitro*

En contexte d'infection, la quantité de protéines STAT1 activées phosphorylées en position T701 est réduite dans des cellules VERO infectées par NiV et traitées à l'IFNβ (Ciancanelli et al. 2009). Cet effet du virus est directement lié à la capacité de ses produits issus du gène P à lier STAT1, puisque la quantité de STAT1 activées n'est pas réduite dans les VERO infectées avec un NiV porteur de la mutation G121E dans ses protéines P, V et W par rapport aux cellules non infectées. Sans stimulation à l'IFN, les protéines STAT1 sont localisées dans le cytoplasme des cellules non infectées, alors qu'elles sont localisées dans le noyau des cellules infectées par NiV. 24h après une stimulation à l'IFN, les protéines STAT1 sont recyclées vers le cytoplasme des cellules non infectées, alors qu'elles restent séquestrées dans le noyau des cellules infectées. Ainsi malgré une capacité commune des protéines P, V et W à lier

STAT1, la séquestration préférentielle de STAT1 dans le noyau lors d'une infection par NiV suggère un effet prépondérant de la protéine W en contexte infectieux. Cependant, en cellules HeLa, cette séquestration préférentielle de STAT1 par W lors de l'infection par HeV semble être moins évidente (Lieu et al. 2015) que lors de l'infection par NiV (Ciancanelli et al. 2009). Ainsi, selon le type cellulaire et selon le virus (NiV ou HeV), les détails des rôles respectifs de P, V et W dans l'inhibition de la voie JAK/STAT restent à préciser.

L'infection de cellules HMVEC-L avec des virus NiV V/W ko et C/V/W ko (MOI 5) montre une augmentation significative de l'activation des ISGs 12h après infection (Lo et al. 2012) (**Tableau 2**), suggérant une implication des protéines V et W dans l'inhibition de la voie de signalisation de l'IFN de type 1. Mais comme pour la production d'IFN (cf. « 2. Effets des PNS sur la production des cytokines en contexte infectieux », dans cette partie), ces résultats pourraient être dus en tout ou partie à une augmentation artificielle de la réplication virale avec ces virus déficients, comme c'est également le cas avec le virus C ko. Par contre, l'augmentation significative de l'activation des ISGs 12h après infection par le virus portant la mutation ponctuelle G125E montre bien l'importance de l'interaction des protéines P, V et W avec STAT1 pour l'inhibition de la réponse à l'IFN de type 1 (**Tableau 2**), sans que l'on sache le rôle individuel de chacune de ces protéines.

La capacité inhibitrice de NiV sur la réponse à l'interféron de type 1 reste malgré tout sujette à discussion à cause du caractère contradictoire des études publiées. En cellules VERO infectées à MOI 2, 24h après infection, une inhibition de la voie de signalisation de l'interféron stimulée par IFNα est observée lors de l'infection par NiV (Yoneda et al. 2010). L'inhibition de la réponse interféron par les NiV déficients pour V(CTD), pour W(CTD) ou pour la C n'est pas étonnante du fait de la présence de produits du gène P liant STAT1 dans ces virus. Cependant, dans les cellules humaines 293T et Hep-2, infectées par NiV et HeV à MOI 1, la voie de signalisation de l'interféron stimulée par IFNβ a été démontrée toujours active 24h après infection (Virtue et al. 2011a). Ces résultats ont été expliqués par une production de protéines virales moins importante en contexte d'infection par rapport au contexte de transfection. Par rapport aux résultats obtenus en cellules VERO, la différence entre les MOI et les types cellulaires utilisés a été proposée comme explication de la divergence des résultats. A contrario, la même équipe a démontré qu'en cellules PaLuT02 de chauves-souris infectées par NiV à MOI 10, la réponse interféron stimulée par IFNα était inhibée 24h après infection (Virtue et al. 2011b). Ainsi, bien que l'infection de cellules de chauve-souris par HeV n'inhibe pas la production constitutive d'IFNα (Zhou et al. 2016), il y aurait bien une inhibition de la voie de signalisation de l'IFN de type 1 par les Henipavirus chez leurs hôtes réservoirs. L'interprétation de cet ensemble de résultats est délicate à cause de la multiplicité des MOI et des types cellulaires utilisés dans les différentes études. En outre, dans toutes les études exposées ci-dessus, la réponse à l'IFN a été évaluée dans des cellules où l'infection par NiV était déjà installée (24h après infection) et où les protéines P, V et W devaient être produites en quantité (Kulkarni et al. 2009). Ainsi pour évaluer l'importance d'une production constitutive d'IFNα et d'une activation des ISGs préalable à l'infection pour le contrôle des Henipavirus chez leurs

hôtes naturels, il pourrait être intéressant d'évaluer l'impact d'une pré-exposition avec de l'IFN sur la cinétique d'infection par NiV.

4. Rôle des protéines non structurales de NiV *in vivo*

L'importance des protéines P, V et W dans le pouvoir pathogène des Henipavirus a été soulignée par la découverte du CeV, Henipavirus dépourvu de site d'édition et donc de protéines V et W (Marsh et al. 2012) (**Figure 1**). Isolé à partir d'échantillons d'urine de chauves-souris, le CeV code également pour une P dont le site d'interaction avec STAT1 présente une faible homologie de séquence avec les P de NiV et HeV (Lieu et al. 2015), avec la conservation d'un seul parmi les cinq résidus G121, G125, G127, G135, et Y116, décrits comme critiques chez NiV (Ciancanelli et al. 2009). Corrélativement, la séquestration de STAT1 sous stimulation IFNα dans des cellules HeLa infectées par CeV est modeste. Cette double absence de V/W et de résidus importants pour l'interaction avec STAT1 coïncide avec une absence de pouvoir pathogène du CeV chez le furet et le cochon d'Inde, deux espèces modèles pour l'étude de la pathogénie de NiV (Marsh et al. 2012).

L'importance des protéines non structurales de NiV a également été mise en évidence par l'infection de différents modèles d'animaux avec des virus déficients pour les différentes protéines. Aucune mortalité n'a été observée lors de l'infection de hamsters par NiV V(CTD) ko (Yoneda et al. 2010) et une mortalité réduite a été observée lors de l'infection par NiV C ko dans Mathieu et al. 2012, voir pas de mortalité dans Yoneda et al. 2010. NiV W(CTD) ko présente une mortalité dose-dépendante similaire au NiV WT lors de l'infection de hamsters, mais la propagation de NiV W(CTD) ko dans les organes est moins importante et plus lente. Des résultats similaires ont été obtenus chez le furet (Satterfield et al. 2015). Alors que tous les furets infectés par NiV WT et NiV W(CTD) ko étaient morts à 8 jours et 11 jours après challenge respectivement, aucune mortalité n'a été observée lors de l'infection avec le virus NiV V(CTD) ko et une réponse anticorps s'est mise en place. Avec ce virus, l'infection semble bien initiée, mais elle est rapidement contrôlée. Cependant, contrairement à ce qui avait été observé chez le hamster, il n'y a pas de diminution de la mortalité des furets infectés avec NiV C ko par rapport à ceux infectés avec le virus WT (Satterfield et al. 2016). Par contre, l'infection des furets avec un NiV W et C ko induit une mortalité de 60%. L'analyse macroscopique et histologique des organes des furets infectés avec les différents virus a ainsi permis aux auteurs de proposer un modèle des différents rôles immunomodulateurs des protéines V et W (**Figure 10**) :

- NiV WT se dissémine dans les poumons, dans la rate et dans l'endothélium cérébral. Les furets succombent de l'atteinte pulmonaire avant qu'une réponse anticorps n'ait été mise en place.
- L'infection par NiV W(CTD)ko est limitée dans les poumons, mais NiV W(CTD)ko se dissémine dans la rate et dans l'endothélium cérébral jusqu'à infecter les

neurones, aboutissant à une mortalité différée causée par l'atteinte neurologique.

- NiV V(CTD)ko est incapable de se disséminer efficacement dans les poumons. Une réponse anticorps est détectable dès le 6ème jour après challenge, comme cela avait été observé chez les hamsters (Yoneda et al. 2010).

Ainsi, lors de l'infection de furets par NiV, la protéine V est le déterminant majeur du pouvoir pathogène, alors que la protéine W module la réponse inflammatoire de façon à déterminer la dissémination du virus à travers l'organisme (Satterfield et al. 2015). A noter cependant dans cette étude que le parallèle systématique fait entre les lésions observées *in vivo* et la production de cytokines par les cellules endothéliales HPMEC infectées *in vitro*, tend à faire oublier que d'autres types cellulaires sont infectées *in vivo*, notamment les cellules épithéliales du tractus respiratoire qui sont les premières cibles du virus (Baseler et al. 2016), et à minimiser leur rôle dans la réponse inflammatoire.

Les PNS sont donc des facteurs déterminants du fort pouvoir pathogène de NiV, même si le mécanisme exact et l'importance relative de chaque protéine non structurale dans la modulation de la réponse antivirale restent incomplètement établis. L'inhibition des voies de production et de signalisation de l'IFN de type 1 par les PNS de NiV a particulièrement été étudiée au cours des 19 dernières années. Cependant, certains aspects de la réponse inflammatoire ont été négligés, malgré un certain nombre d'éléments indiquant leur importance. En effet, les IFNs ne sont pas les seules cytokines dont la production est modulée lors d'une infection par NiV. En particulier, les chimiokines responsables de l'attraction des leucocytes pourraient revêtir une réelle importance dans la pathogénie du virus (Lo et al. 2010 ; Mathieu et al. 2011 ; Mathieu et al. 2012 ; Mathieu et al. 2012 ; Lo et al. 2012 ; Satterfield et al. 2015), notamment IL-8, CCL2, CCL5, CXCL10… Toutes ces chimiokines sont sous le contrôle de la voie NF-κB. Bien que cette voie puisse être déclenchée par les RLRs suite à l'entrée de NiV dans la cellule, d'autres récepteurs sont responsables de son activation. Compte tenu de l'importance de cette voie dans différents mécanismes cellulaires (division, réparation de l'ADN, survie cellulaire, réponse inflammatoire, …), l'étude de la voie NF-κB lors de l'infection par NiV pourrait apporter un certain nombre d'éléments pour la compréhension du fort pouvoir pathogène des Henipavirus.

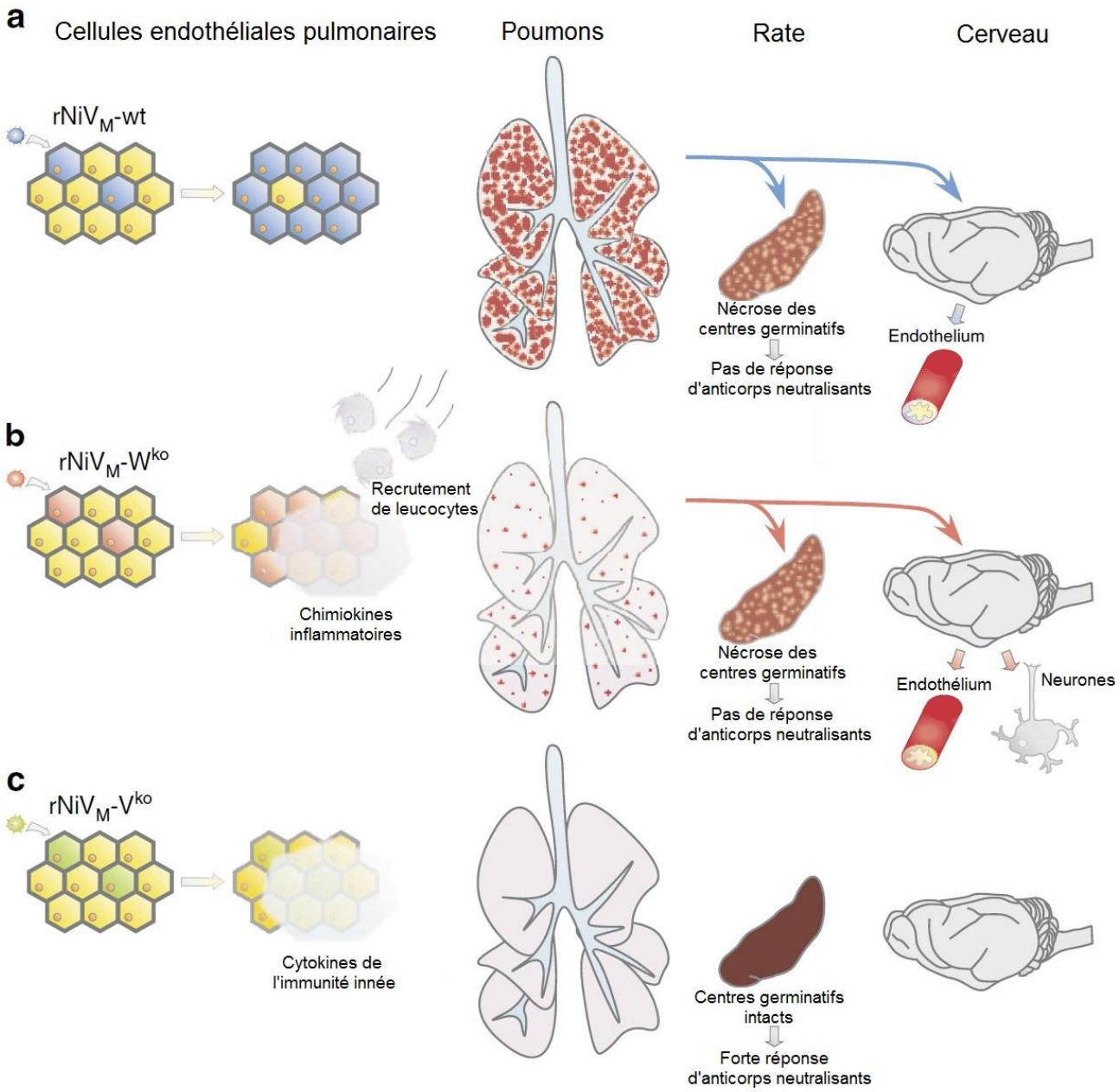


Figure 10 : *Réprésentation de la dissémination chez le furet de différents NiV recombinants en fonction de leur incapacité à produire la protéine V ou la protéine W (d'après Satterfield et al. 2015).* ***A****, NiV WT se dissémine dans les poumons (causant des lésions étendues), dans la rate et dans l'endothélium cérébral entraînant des signes neurologiques modérés. Les furets succombent de l'atteinte pulmonaire avant qu'une réponse anticorps n'ait été mise en place.* ***B****, l'infection par NiV W(CTD) ko est limitée dans les poumons et est caractérisée par des lésions pulmonaires modérées. Cette atteinte modérée est mise en parallèle par Satterfield et al avec la production d'un ensemble de chimiokines dans des cellules HPMEC infectées avec NiV W(CTD) ko et corroborant le recrutement de leucocytes observé dans les tissus. NiV W(CTD) ko se dissémine également dans la rate et dans l'endothélium cérébral jusqu'à infecter les neurones, aboutissant à une mortalité différée causée par l'atteinte neurologique.* ***C****, NiV V(CTD) ko est incapable de se disséminer efficacement dans les poumons. Ce blocage de la dissémination est mis en parallèle avec la production d'un ensemble de cytokines antivirales par les cellules HPMEC infectées avec NiV V(CTD) ko. Aucune lésion n'est détectée dans la rate et dans le cerveau, aucune mortalité n'est observée, mais une réponse anticorps est détectable dès le 6ème jour après challenge.*

III. LA VOIE NF-κB

A. Généralités sur la voie NF-κB

1. Découverte de la voie

La voie NF-κB (pour « nuclear factor binding near the k light-chain gene in B cells ») porte le nom de la protéine se liant au motif κB spécifique et conservé de l'ADN découverte par Ranjan Sen (Sen et Baltimore 2006). Le motif κB est une séquence presque palindromique, avec un consensus de 5'-GGGRNWYYCC-3' (où N est une base quelconque, R une purine, W une adénine ou thymine et Y une pyrimidine) (Sen et Baltimore 2006 ; Lenardo et al. 1987). La séquence κB est présente dans le promoteur ou l'enhancer de plusieurs centaines de gènes aux fonctions variées. Ainsi, à travers l'activation ou la répression de ces gènes cibles, la voie NF-κB est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires (telles que la division, la réparation de l'ADN, la réponse immunitaire, etc…).

2. Une famille de facteurs de transcription

En fait, NF-κB est le nom générique d'une famille de cinq facteurs de transcription : p50, p52, RelA (ou p65), RelB et c-Rel (**Figure 11A**). Ils ont en commun un domaine N-terminal appelé domaine d'homologie Rel (RHD). Le RHD est composé de 300 acides aminés divisés en deux sous-domaines. Le sous-domaine N-terminal ressemble au domaine de liaison à l'ADN de p53 et permet la reconnaissance du motif spécifique κB. Le sous-domaine C-terminal composé de résidus hydrophobes constitue une interface avec des protéines inhibitrices IκBs (NF-κB Inhibitor) (**Figure 11B**) et un site d'homo et/ou hétéro-dimérisation des facteurs de transcription. Les deux sous-domaines sont reliés par une charnière qui s'accroche sur les deux côtés du site κB à travers le sillon principal de l'ADN (Hayden et Ghosh 2012 ; Smale 2012). Les cinq facteurs de transcription s'associent, deux à deux, pour former potentiellement 15 combinaisons différentes (Smale 2012). L'existence de treize d'entre elles a été démontrée (S. Ghosh, communication personnelle (Zhang et al. 2017)).

RelA, RelB et c-Rel sont directement synthétisés en tant que protéines fonctionnelles avec un domaine d'activation de la transcription (TAD) (**Figure 11A**). Les protéines p50 et p52 proviennent des deux protéines précurseurs, p105 (gène NFKB1) et p100 (gène NFKB2) respectivement. Une région C-terminale de p105 et p100, contenant des répétitions ankyrines (AnkR), est clivée post-traductionnellement permettant ainsi la formation des protéines p50 et p52 dépourvues de TAD (**Figure 11A**). Les hétérodimères contenant au moins un TAD sont des activateurs transcriptionnels, tandis que les homodimères p50 ou p52 sont des répresseurs. Puisque les combinaisons de dimères peuvent reconnaître des variantes distinctes du site κB avec des affinités différentes, de nombreux modèles de régulation génétique peuvent être générés à partir de cette poignée de protéines (Smale 2012).

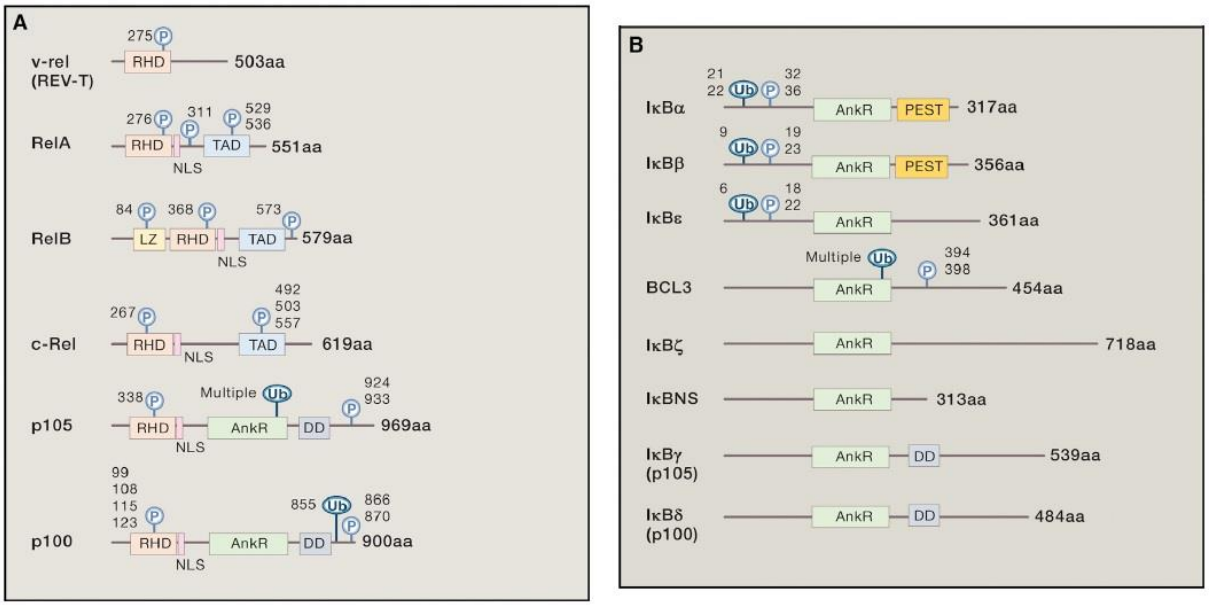


***Figure 11 : A**, représentations schématiques des différents domaines protéiques des facteurs de transcriptions de la famille de NF-κB. **B**, représentations schématiques des différents domaines protéiques des inhibiteurs de NF-κB de la famille des IκBs (d'après Zhang et al. 2017).*

Les facteurs de transcription RelA, p50 et c-REL sont associés à la voie dite canonique, et RelB et p52 à la voie non canonique. Les deux dimères paradigmatiques de la voie canonique et de la voie non canonique sont respectivement p50/p65 et p52/RelB. Cependant, d'autres combinaisons incluant les homodimères p50/p50 et p52/p52 ou même l'hétérodimère p52/RELA existent permettant diverses fonctions (Smale 2012). Même avec 15 formes potentielles de dimères, la régulation de plusieurs centaines de gènes nécessite que les facteurs de transcription soient présents à une concentration caractéristique et à un moment précis après le déclenchement de la voie. De plus, NF-κB est rarement le seul facteur de transcription requis pour activer/désactiver un gène. En effet, il agit de concert avec d'autres facteurs de transcription pour moduler la réponse des gènes cibles. Ainsi la présence ou non de tel ou tel facteur de transcription (de la famille de NF-κB ou non), et en différentes concentrations, sont autant de paramètres d'ajustement d'un gène cible comme cela a déjà été décrit pour l'enhanceosome de l'IFNβ (Panne et al. 2007). Ensemble, ils recrutent des co-activateurs, des protéines de remodelage de la chromatine, etc… qui permettent à NF-κB de réaliser ce tour de force qu'est la régulation fine de centaines de gènes (Hayden et Ghosh 2012).

NF-κB est l'exemple type du facteur tenu inhibé dans la cellule et permettant l'activation d'une voie de réponse ordonnée immédiatement après la stimulation, sans la nécessaire latence d'une transcription et/ou d'une traduction. Une fois la résolution du stimulus atteinte, la voie se réinitialise à son niveau basal. Cette réponse ordonnée met en jeu toute une série de processus intermédiaires : formation de complexes protéiques, phosphorylation des résidus sérine, thréonine ou tyrosine, polyubiquitination, etc… (Hayden

et Ghosh 2008, 2012). Les deux voies, canonique et non canonique, correspondent à deux modes d'activation différents.

B. Activation de la voie canonique

1. Formation des complexes protéiques de transduction du signal

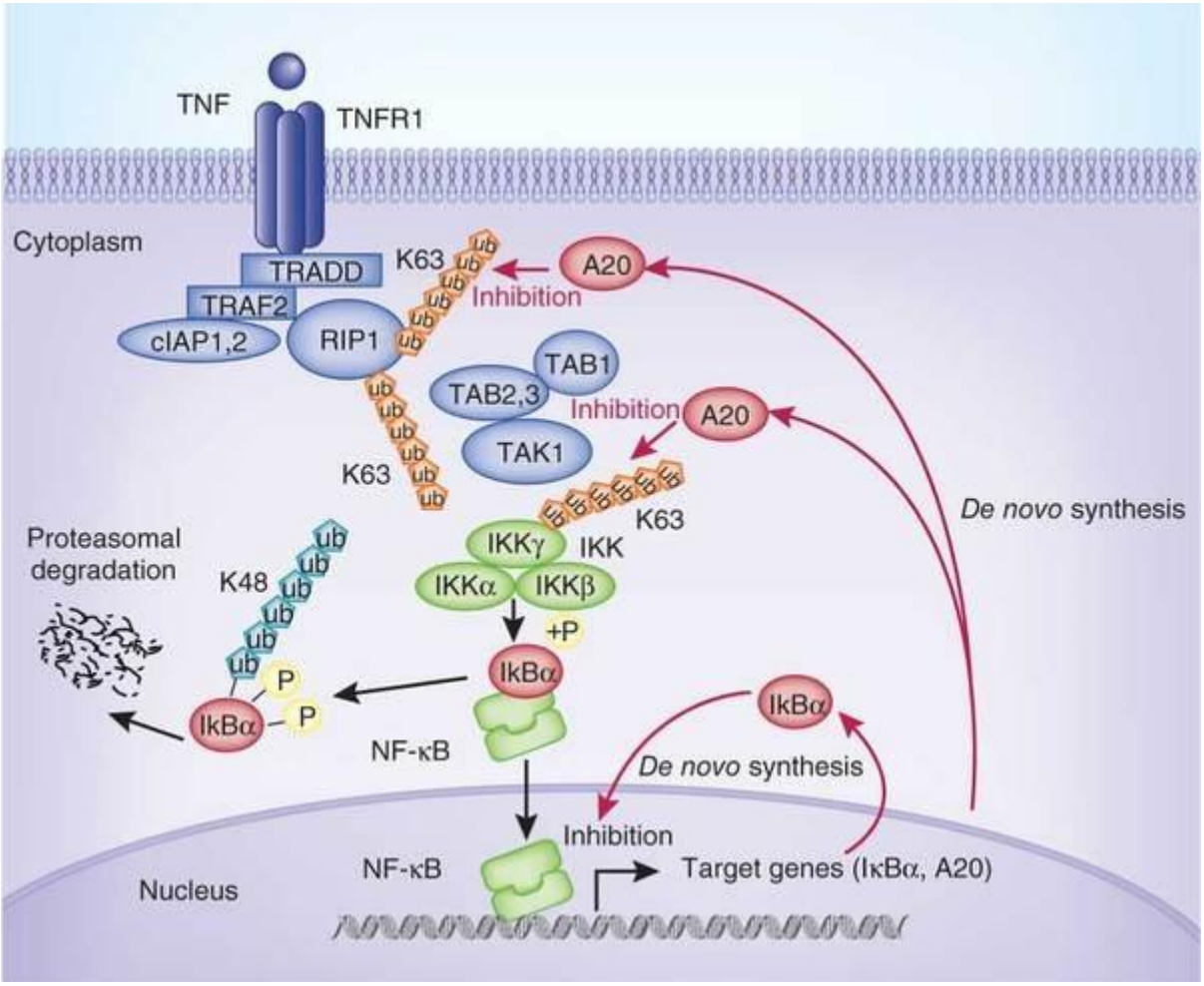


Figure 12 : *Représentation schématique de la voie canonique NF-κB activée par TNFR. L'engagement du récepteur permet la formation d'un complexe TRADD/TRAF2/cIAP/RIP-1 à partir duquel se forme des chaînes de polyubiquitines linéaires liées à K63 (grâce au LUBAC (non représenté sur ce schéma)). Ces chaînes permettent le recrutement de l'IKK complexe, qui une fois activé, va permettre la phosphorylation des sous-unités inhibitrices IκBs (ici IκBα). Suite à cette phosphorylation, les IκBs vont être polyubiquitinés (liées à K48) et adressés au protéasome pour être dégradés. Ainsi libérés, les facteurs de transcription de NF-κB entrent dans le noyau pour y jouer leur rôle dans la régulation d'une centaine de gènes. Ils vont en outre activer les gènes codant pour les IκBs et le complexe A20 permettant ainsi l'établissement d'un rétrocontrôle négatif (d'après Zhang et al. 2017).*

La voie canonique NF-κB peut être activée par de nombreux récepteurs cellulaires membranaires ou cytoplasmiques : TNFR, IL-1R, TLR, RLR, NLR, etc … L'activation de ces récepteurs entraîne l'assemblage de différents médiateurs protéiques, dont le complexe linéaire d'assemblage d'ubiquitine (LUBAC) permettant la formation de chaînes de

polyubiquitines linéaires (liées à K63) servant de mortier à la transduction du signal (Dondelinger et al. 2016). Particulièrement, la famille de protéines TRAFs de (TRAF1-TRAF7) permet la transduction du signal entre les différents récepteurs et les différents médiateurs de signalisation. À l'exception de TRAF1, tous les TRAFs ont un domaine RING (Really Interesting New Gene) qui peut fonctionner comme une ubiquitine ligase E3, bien que cette fonction n'ait été pour l'instant démontrée que pour TRAF2 et TRAF6 (Chen 2005). Les protéines TRAFs peuvent fonctionner en aval de plusieurs récepteurs, et plusieurs récepteurs peuvent utiliser plus d'une protéine TRAF pour la transduction du signal. Beaucoup de fonctions des protéines TRAFs sont liées à la voie NF-κB où elles peuvent réguler positivement ou négativement la signalisation canonique et non canonique (Bradley et Pober 2001).

Par exemple, le processus d'induction de la voie par le récepteur TNF (TNFR) a été relativement bien décrit (**Figure 12**). La stimulation par le TNFα du TNFR recrute les protéines RIP-1 (receptor interacting protein-1), TRADD (Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain), TRAF2, cIAP (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein), TAB (TAK1-binding protein) et TAK1 (TGFβ-activated kinase 1) dans un complexe à partir duquel le LUBAC assemble une chaîne d'ubiquitines linéaires pour l'assemblage du complexe enzymatique central de la voie canonique NF-κB, l'IKK complexe (IκB kinase complex) (Iwai 2014). Des modifications de l'ubiquitination modulent la composition du complexe, ce qui détermine si l'engagement de TNFR entraîne l'induction de NF-κB (et la survie de la cellule) ou l'apoptose de la cellule via les différentes protéines RIPs (Dondelinger et al. 2016).

Les RIPs 1-7 sont des adaptateurs et des kinases qui transmettent des signaux provenant d'une grande variété de récepteurs de surface et de capteurs de contraintes intracellulaires jusqu'à différents médiateurs transcriptionnels (JNK (Jun N-terminal Kinases), ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) et p38, NF-κB, etc…), y compris des médiateurs de la mort cellulaire (Meylan et Tschopp 2005). Ainsi, les complexes de transduction sont également impliqués dans l'envoi de signaux parallèles (en plus de la voie NF-κB) permettant de coordonner les réponses cellulaires nécessaires à une régulation fine des gènes cibles.

2. Activation de l'IKK complexe et dégradation de l'inhibiteur de NF-κB

La voie canonique, outre ces différents modes d'activation et les différents facteurs de transcription qu'elle met en œuvre, se distingue de la voie non canonique par la formation d'un complexe enzymatique, appelé IKK complexe, permettant de dégrader les inhibiteurs des facteurs de transcription de NF-κB (Hayden et Ghosh 2008).

La chaîne d'ubiquitine formée suite à l'activation d'un récepteur permet le recrutement d'une sous-unité régulatrice non catalytique appelée NEMO (NF-κB Essential Modulator) ou IKKγ. NEMO s'associe en tétramère (Tegethoff et al. 2003) et recrute deux kinases, IKKα et IKKβ, permettant la formation de l'IKK complexe (**Figure 12**). La pleine maturation du complexe nécessite l'action de différentes protéines chaperonnes telles que HSP90 et Cdc37 (HSP90 co-chaperone) (Chen al. 2002). Suite à l'activation de la voie, la

transautophosphorylation des kinases IKKα et IKKβ permet l'activation complète de l'IKK complexe (Miller et Zandi 2001).

Chacun des facteurs de transcription de NF-κB possède un NLS, situé juste après leur RHD, qui permet leur translocation dans le noyau. Comme précédemment indiqué, le domaine C-terminal du RHD constitue une interface pour les IκBs. En effet, les inhibiteurs IκBa, IκBb, IκBε, BCL-3, IκBζ et IκBNS contiennent tous 5 à 7 répétitions d'ankyrines en tandem (AnkRs). Ces AnkRs sont des domaines de 33 acides aminés qui s'associent en hélices capables de se lier au RHD des facteurs de transcription NF-κB, couvrant ainsi le NLS proximal et empêchant leur translocation nucléaire. Dans la voie canonique, IKKβ est nécessaire à la phosphorylation des protéines de la famille des IκBs pour leur adressage au protéasome (Ben-Neriah 2002) (**Figure 12**). IKKα, non nécessaire, a plutôt un rôle dans la régulation de la voie canonique (Pelzer et Thome 2011). Par exemple, IKKβ phosphoryle IκBα sur les résidus sérines 32 et 36, ou IκBβ sur les résidus sérines 19 et 23. Les IκBs phosphorylés sont ensuite polyubiquités par le complexe E3-ubiquitine ligase SCFb-TrCP pour leur adressage au protéasome et leur dégradation (Ben-Neriah 2002).

La dégradation des IκBs par le protéasome libère les NLS des dimères NF-κB permettant leur entrée dans le noyau et l'activation des gènes. La transcription par NF-κB est également renforcée par la phosphorylation des domaines Rel (Hayden et Ghosh 2008). La mutation de l'une des sérines phosphorylées par IKKβ bloquera la dégradation d'IκB et inhibera la signalisation. En outre, NF-κB induit l'activation des gènes codants pour les protéines IκBs et le complexe A20 établissant une boucle de rétrocontrôle négatif (Hayden et Ghosh 2012) (**Figure 12**). En effet, IκBα et IκBε peuvent rentrer dans le noyau et récupérer le NF-κB lié à l'ADN pour arrêter la transcription (Hayden et Ghosh 2008). L'hétérodimère canonique p50/p65 est principalement régulé par IκBα. Le contrôle de la localisation nucléaire via IκB a deux conséquences essentielles : c'est un point de contrôle principal pour l'expression de gènes induits par NF-κB et il permet aux complexes de transcription NF-κB préformés d'être mis en action quasi instantanément, ce qui permet une réponse rapide aux agents pathogènes ou aux stimuli inflammatoires.

B. Activation de la voie non canonique

L'activation de la voie NF-κB non canonique n'est ni régulée par l'IKK complexe (même si elle implique aussi l'une de ses sous-unités, IKKα) ni par les IκBs classiques. Elle ne répond donc pas aux inducteurs de la voie canonique (Nishikori 2005). Dans la voie non canonique, p100 est principalement complexé avec RelB. p100 possède un domaine AnkR qui joue le rôle d'IκB (aussi appelé IκBδ) pour retenir l'hétérodimère p100/RelB dans le cytoplasme (**Figure 11**). La phosphorylation du domaine AnkR de p100 est indépendante de NEMO et d'IKKβ, et donc de l'IKK complexe. Cela nécessite la protéine NIK (kinase inductrice de NF-κB). Dans la cellule non stimulée, le complexe TRAF2/TRAF3/cIAP ubiquitine NIK, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome (**Figure 13**). Les récepteurs de la voie non canonique

permettent de libérer NIK de l'action de ce complexe, ce qui entraîne la phosphorylation d'IKKα par NIK et sa dimérisation. IKKα ainsi activée phosphoryle spécifiquement le complexe cytoplasmique p100/RelB sur les serines 866 et 870 provoquant l'ubiquitination du domaine AnkR C-terminal de p100, sa protéolyse partielle en p52 et l'entrée nucléaire de p52/RelB (Sun 2011).

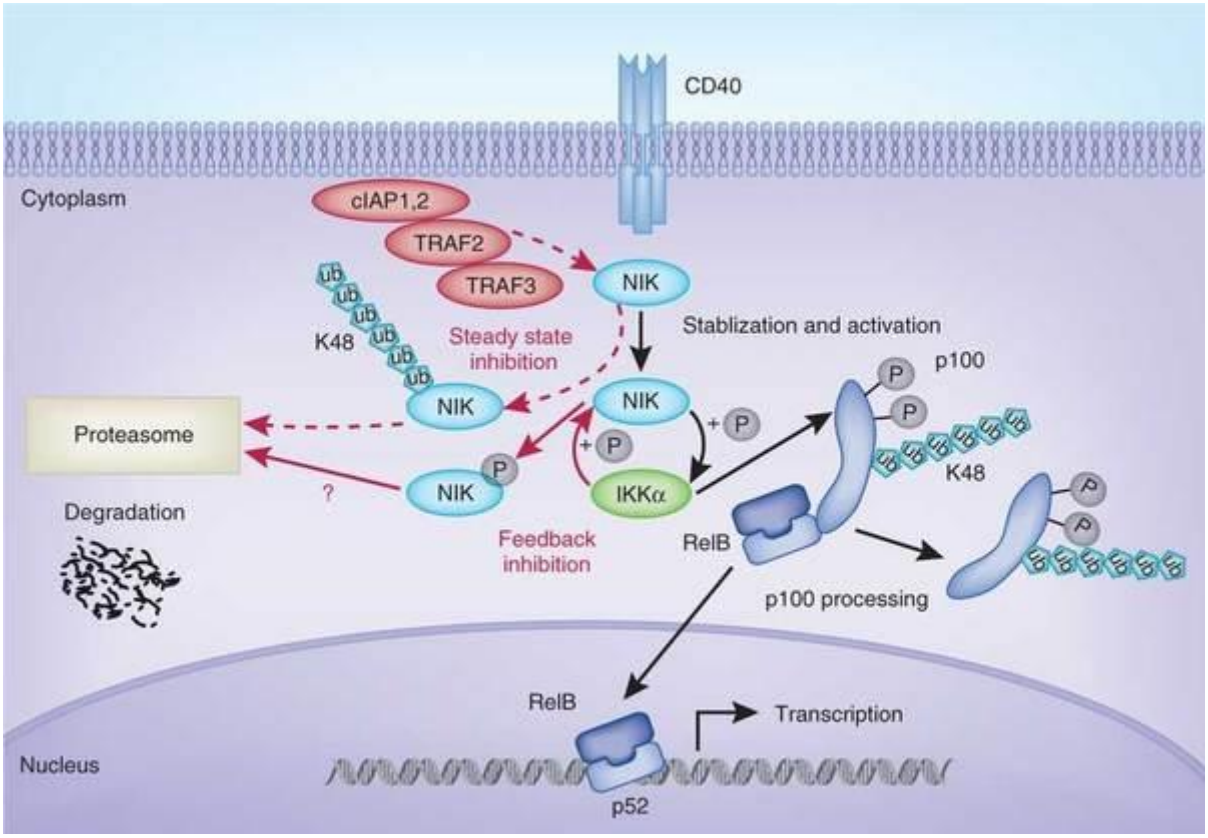


Figure 13 : *Représentation schématique de la voie non canonique de NF-κB activée par CD40. L'engagement du récepteur permet de libérer NIK de l'action du complexe TRAF2/TRAF3/cIAP. NIK phosphoryle alors IKKα pour sa dimérisation. Ainsi activée, IKKα phosphoryle p100 provoquant l'ubiquitination de son domaine AnkR C-terminal de p100, sa protéolyse partielle en p52 et l'entrée nucléaire de p52/RelB pour y jouer leur rôle dans la régulation des gènes. La phosphorylation de NIK par IKKα entraîne sa dégradation par le protéasome permettant l'établissement d'un rétrocontrôle négatif (d'après Zhang et al. 2017).*

Alors que la voie canonique répond rapidement aux stimuli (comme les menaces infectieuses), la voie non canonique a une cinétique lente et soutenue dépendante de la synthèse de protéines, ce qui est cohérent avec son rôle dans l'organogenèse (Baltimore 2011 ; Hayden et Ghosh 2008). Nombre de ses inducteurs sont un sous-groupe de la superfamille des TNFRs : BAFFR (B cell-activating factor receptor), CD40 (Cluster of Differentiation 40), RANK (Receptor Activator of NF-κB), CD137, TNFRSF14 (TNF Receptor Superfamily member 14), CD134, GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein), TNFSF12, TNFR2, CD30, etc… chacun d'entre eux probablement lié à une des différentes fonctions de la voie non canonique (Gerondakis et Siebenlist 2010 ; Mackay et Cancro 2006). Par exemple, BAFF

permet la différenciation et la survie des lymphocytes B périphériques (Mackay et Cancro 2006), tandis que RANK régule la formation des os et la fonction des cellules dendritiques (Hayden et Ghosh 2008).

C. Importance de NF-κB pour la réponse immunitaire

1. NF-κB à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité acquise

L'importance de la voie NF-κB dans le système immunitaire a été très largement décrite. En effet, de nombreux troubles génétiques chez l'Homme affectant NF-κB entraînent une perturbation importante du système immunitaire (Courtois et Smahi 2006). Les cellules des épithélia fournissent la première ligne de défense contre les agents bactériens, viraux, fongiques, etc… Chez les mammifères, de nombreuses incursions mineures sont éliminées uniquement par l'immunité innée, alors qu'une inflammation plus étendue active les lymphocytes B et T de l'immunité adaptative. A l'origine des deux, il y a une forte implication de NF-κB (Ben-Neriah 2002).

La voie canonique, et particulièrement p50/p65, est induite par toutes sortes de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNFα et IL-1β, par des antigènes, des médiateurs immunitaires solubles et par de nombreux PAMPs bactériens et viraux. Tous ces inducteurs déclenchent potentiellement NF-κB dans différents types de cellules immunitaires (Hayden et Ghosh 2008, 2012), comme les lymphocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, etc... L'activation de la voie va être à l'origine de la production finement régulée de tout un ensemble de chimiokines, de cytokines, de molécules d'adhésion, de médiateurs inflammatoires et d'inhibiteurs de l'apoptose permettant la transmission de l'information entre cellules. Ainsi, l'induction de NF-κB module directement ou indirectement des milliers de gènes, qui en modifiant le programme de transcription des cellules immunitaires, les font passer de la quiescence à un phénotype effecteur capable de lutter contre les agents pathogènes (Lenardo et al. 1989). NF-κB joue donc le rôle de chef d'orchestre de l'immunité globale, ce qui en fait une cible récurrente des mécanismes d'immuno-modulation de divers pathogènes.

2. Modulation de la voie NF-κB par les virus, cas particulier des paramyxovirus

La voie NF-κB constitue une voie majeure de l'immunité antivirale. Pour se répliquer et persister dans leurs hôtes, de nombreux virus ont développé différentes stratégies pour s'évader de la voie NF-κB ou même l'exploiter à leur bénéfice. Face à la somme très importante de travaux relatifs aux perturbations de la voie NF-κB par les virus et à la très grance variabilité des mécanismes de ces perturbations, le choix a été fait de limiter cette partie aux virus relativement proches de NiV.

Tableau 3 : *Résumé des données in vitro d'induction des cytokines et des ISGs lors de l'infection par NiV en cellules endothéliales (Mathieu et al. 2012 ; Lo et al. 2012 ; Satterfield et al. 2015). L'induction des différentes protéines a été évaluée en cellules HUVEC ou HPMEC, par qPCR, ELISA ou multiplex, lors de l'infection par différents virus recombinants (déficients pour la protéine C ou V(CTD) ou W(CTD)) par rapport à l'infection avec le virus sauvage. nr indique que la condition n'a pas été réalisée. + indique qu'il y a augmentation de l'induction d'une protéine donnée dans la condition testée et NA, qu'il n'y a pas d'augmentation. Dans les résultats présentés ici, aucune donnée ne montre une diminution de l'induction d'une protéine en l'absence d'une des PNS. Pour chaque protéine, il a également été indiqué si un site κB est présent ou non dans le promoteur ou l'enhancer du gène correspondant et si des données ont confirmé une régulation de ce gène par NF-κB (« NF-kB Target Genes » NF-kB Transcription Factors, Boston University » 2017).*

Protéine	Type cellulaire	MOI	C ko	V ko	W ko	Site IκB	Contrôlé par NF-κB
TNF-α	HPMEC	0,01	nr	+	+	Oui	Oui
IL-1β	HUVEC	1	+	nr	nr	Oui	Oui
IL-6	HPMEC	0,01	nr	+	+	Oui	Oui
IL-8	HPMEC	0,01	nr	+	+	Oui	Oui
	HUVEC	1	+	nr	nr		
IL-10	HPMEC	0,01	nr	+	+	Oui	Oui
CCL2	HPMEC	0,01	nr	+	+	Oui	Oui
	HUVEC	1	+	nr	nr		
CCL5	HPMEC	5	+	+	+	Oui	Oui
CCL11	HPMEC	0,01	nr	+	+	Oui	Oui
CCL13	HPMEC	0,01	nr	+	+	Non	
CCL15	HPMEC	0,01	nr	+	+	Oui	Oui
CCL20	HUVEC	1	+	nr	nr	Oui	Oui
CXCL2	HPMEC	0,01	nr	NA	+	Oui	Oui
	HUVEC	1	+	nr	nr		
CXCL3	HUVEC	1	+	nr	nr	Oui	Oui
CXCL5	HPMEC	00,1	nr	NA	+	Oui	Oui
CXCL6	HUVEC	1	+	nr	nr	Oui	Non prouvé
CXCL10	HPMEC	0,01	nr	+	+	Oui	Oui
	HUVEC	1	+	nr	nr		
	HPMEC	5	+	+	NA		
CXCL11	HPMEC	0,01	nr	+	+	Oui	Non prouvé
	HUVEC	1	+	nr	nr		
CX3CL1	HPMEC	0,01	nr	+	+	Non	
CSCL1	HPMEC	0,01	nr	NA	+	Oui	Oui
RIG-I	HPMEC	5	+	NA	NA	Non	
TLR3	HPMEC	5	+	NA	NA	Non	
STAT1	HPMEC	5	+	NA	NA	Non	
MX1	HPMEC	5	+	+	NA	Oui	Non prouvé
CASP1	HPMEC	5	+	NA	NA	Non	
IFN-β	HUVEC	1	+	nr	nr	Oui	Oui
	HPMEC	5	+	+	+		

Il existe plusieurs exemples d'inhibition de la voie NF-κB par les paramyxovirus ou par l'une de leurs protéines. Le domaine C-terminal de la protéine V de MeV interagirait avec p65

pour limiter sa translocation nucléaire dans les cellules 293T et Hep2 (Schuhmann et al. 2011). L'infection de cellules L929 par un MuV recombinant incapable de produire la protéine SH entraîne une augmentation de l'activation de la voie NF-κB, de la production de TNFα et de l'apoptose par rapport à l'infection avec le virus sauvage (Xu et al. 2011), suggérant l'inhibition de la voie NF-κB par cette protéine. La protéine SH de RSV présente une fonction similaire à celle de MuV (Fuentes et al. 2007).

A l'inverse, certains virus sont présentés pour activer la voie NF-κB, parfois même ceux pour lesquels un mécanisme d'inhibition est également décrit. SeV déclencherait l'activation des IKKs pour induire la dégradation des IκBs (Algarté et al. 1999). RSV est décrit pour induire une inflammation excessive lors des pneumonies aiguës dont il est responsable. Cette inflammation est due à la production par les cellules épithéliales pulmonaires infectées de tout un ensemble de cytokines et de chimiokines régulées positivement par NF-κB. En effet, l'infection par RSV active à la fois la voie canonique (Yoboua et al. 2010) et la voie non canonique (Choudhary et al. 2005). L'activation des deux voies serait consécutive à des modifications d'oxydoréduction dans les cellules infectées qui cibleraient plusieurs senseurs en amont des voies. En outre, les protéines F (glycoprotéine de fusion) et M2-1 de RSV sont décrites pour activer la production de cytokines régulées positivement par NF-κB dans les monocytes (Kurt-Jones et al. 2000 ; Reimers et al. 2005). MeV active également la voie NF-κB lors de l'infection (Vijayan et al. 2014). La suppression de cette activation de la voie NF-κB par la Sphingosine Kinase 1 limite la réplication virale. Ces données mettent donc en avant l'importance de l'activation de la voie NF-κB pour la réplication de MeV.

Contrairement aux voies de production et de réponse de l'IFN de type 1, peu de données sont disponibles concernant la modulation de la voie NF-κB par les *Henipavirus*. Lors de l'infection des furets et des chevaux par HeV, la présence du microARN miR-146a est augmentée dans le sang (Stewart et al. 2013). miR-146a est impliqué dans la répression d'un élément du complexe A20 inhibiteur de NF-κB. Le blocage de miR-146a réduit la réplication de HeV *in vitro*, suggérant que l'activation de la voie NF-κB pourrait favoriser la réplication du virus. Hypothèse renforcée par le fait que la surexpression d'un dominant négatif IκB inhibe la réplication de HeV. Une communication de Misako Yoneda au 16ème congrès NSV de Sienne en 2015 faisait état d'une interaction entre NiV V et la protéine UBXN1 (Ubiquitin-regulatory-X-domain-containing protein), pour laquelle la première cystéine du CTD de V (non impliquée dans le motif en doigt de Zn) était nécessaire (données non publiées). Cette interaction stabiliserait UBXN1. Or UBXN1 est décrite pour être un inhibiteur de l'activation de l'interféron de type 1 et de NF-κB activés par les RLRs (Wang et al. 2013). Si ces données sont confirmées, l'interaction de NIV V avec UBXN1 pourrait donc induire une inhibition de la voie NF-κB activée par les RLRs. Malgré ces différentes hypothèses, aucune étude ne rapporte clairement un mécanisme de modulation de la voie NF-κB par NiV. Pourtant, plusieurs études montrent une perturbation de la production des cytokines lors de l'infection par NiV (Lo et al. 2012 ; Mathieu et al. 2012 ; Satterfield et al. 2015). Le **Tableau 3** résume les données disponibles sur la modulation des cytokines et des ISGs par chaque PNS de NiV déduites du phénotype observé

consécutif à l'absence de la PNS concernée après infection de cellules humaines avec des virus ko pour la PNS. La protéine C inhibe la réponse inflammatoire précoce, dès 8h après infection (Mathieu et al. 2012). La protéine V inhibe de façon précoce les ISGs (à partir de 12h après infection) (Lo et al. 2012) et dans une certaine mesure, la production des chimiokines (à partir de 72h après infection) (Satterfield et al. 2015). La protéine W inhibe la production des cytokines et des chimiokines à partir de 24h après infection (Satterfield et al. 2015). Ces cytokines sont connues pour avoir un site κB dans leurs promoteurs ou dans leurs enhancers et pour la plupart d'entre elles, l'implication de NF-κB dans l'activation de leurs gènes est confirmée (**Tableau 3**). Ainsi, les PNS de NiV semblent impliquées dans l'inhibition de l'induction de plusieurs cytokines, dont la majorité des gènes correspondants est régulée par NF-κB. La perturbation de la voie NF-κB par NiV reste donc une hypothèse à explorer.

On peut s'interroger pour les cas de MeV et RSV sur la présence à la fois d'une activation de NF-κB et d'un mécanisme d'inhibition. D'un point de vue méthodologique, il est toujours plus pertinent qu'un mécanisme, décrit pour une protéine en contexte de transfection, soit mis en évidence en contexte d'infection virale *in vitro* et *in vivo*. Ce qui n'est pas le cas, par exemple, pour l'effet de V sur p65 rapporté pour MeV (Schuhmann et al. 2011), dont l'interaction n'a pas été rapportée en contexte d'infection (Komarova et al. 2011). Néanmoins, du fait que les virus déclenchent les senseurs cellulaires par leur entrée et leur mécanisme de réplication d'une part et du fait de la multiplicité des signaux de transduction sur lesquels les virus peuvent avoir un effet d'autre part, il est concevable qu'une activation et une inhibition de NF-κB coexiste lors de l'infection virale. Ceci est renforcé par la multiplicité des types cellulaires existant pour lesquels le déclenchement de NF-κB a ses spécificités et dont les mécanismes viraux eux-mêmes dépendent. Enfin, le déroulement du cycle viral met en jeu une cinétique d'apparition des mécanismes : une activation de NF-κB lors de l'entrée du virus dans les premiers moments du cycle viral peut être progressivement contrebalancée par une inhibition du fait de l'accumulation des PNS au cours du cycle. Par la multiplicité des mécanismes mis en jeu, la modulation des voies de signalisation par un virus renforce donc la complexité de la régulation fine des gènes par NF-κB et nous oblige à appréhender ces mécanismes avec modestie à travers de multiples échelles d'espace et de temps.

OBJECTIFS

Les voies de l'IFN de type 1, notamment les voies des RLRs et JAK/STAT, sont des cibles majeures des protéines virales des paramyxovirus. Avec la découverte des Henipavirus, de nombreuses études ont donc prioritairement exploré si de tels mécanismes existaient chez NiV. Ainsi ont été retrouvés les effets de NiV sur les protéines STAT (NiV P, V et W) et MDA5 (NiV V), tandis que des mécanismes jusqu'à présent inédits chez les paramyxovirus ont été découverts (interaction de NiV M avec TRIM6 par exemple). A ce jour, la quasi-totalité des données disponibles sur la modulation des voies de l'immunité innée par NiV concerne les voies en amont des facteurs de transcription IRFs (IRF3, 7 et 9). En comparaison, très peu d'études s'intéressent à de possibles effets de NiV en amont d'autres facteurs de transcription impliqués dans l'immunité innée, tels que NF-κB, AP-1 (Activator Protein 1), p53, C/EBP (CCAAT-Enhancer-Binding Proteins), etc…

Satterfield et al. en 2015 ont mis en évidence un effet inhibiteur de la protéine W de NiV, et dans une moindre mesure de la protéine V, sur la production de tout un panel de chimiokines en contexte d'infection virale. A ce jour, aucun des mécanismes moléculaires impliquant les protéines non structurales, précédemment détaillés chez NiV, ne permet d'expliquer cet effet inhibiteur. Or outre leur régulation par les IRFs et d'autres facteurs de transcription, quasiment toutes ces chimiokines sont décrites pour être régulées par la voie NF-κB. Donc, l'hypothèse d'un effet inhibiteur de la voie NF-κB par les protéines V et W de NiV mérite une exploration. La multiplicité des voies de signalisation (autres que NF-κB), y compris celles des IFN de type 1, perturbées par les PNS de NiV nécessite donc *a minima* de déterminer si les possibles effets des PNS sur la voie NF-κB sont indépendants des mécanismes déjà décrits pour les voies des RLRs et JAK/STAT.

Les hôtes réservoirs des Henipavirus sont des chauves-souris de la famille des *Pteropodidae*. L'infection de ces chauves-souris par NiV est décrite comme asymptomatique, alors que ce virus est hautement pathogène chez de nombreux autres mammifères. Malgré des hypothèses intéressantes (développement de systèmes de régulation du stress oxydatif lié à l'adaptation au vol), les mécanismes sous-jacents à cette absence de virulence de NiV chez ses hôtes naturels restent à ce jour incompris. Une hypothèse séduisante serait un contrôle efficace de l'arsenal de NiV responsable de la modulation de l'immunité innée des chauves-souris consécutif à une co-évolution entre pathogène et hôte. Ainsi, l'exploration des effets du virus dans ces espèces apparait donc pertinente. Plus que les mécanismes couramment décrits pour l'ensemble des paramyxovirus, de tels mécanismes inédits, s'ils existent, pourraient permettre de mieux comprendre les caractéristiques spécifiques des systèmes hôte-réservoir versus fort pouvoir pathogène chez un hôte accidentel des Henipavirus.

Le principal objectif de cette thèse est donc de déterminer si les protéines V et W de NiV ont des effets sur les voies en amont des facteurs de transcription NF-κB en cellules

humaines et le cas échéant, d'en détailler les mécanismes. Du fait du caractère non infectables des cellules dans lesquelles la voie non canonique est surtout active (BAFFR et CD40 présents dans les lymphocytes, RANGE dans les cellules dendritiques, etc… (Mathieu et al. 2011)), l'étude des effets des PNS sur la voie canonique NF-κB a été privilégiée.

Peu d'outils sont actuellement disponibles pour l'étude de l'hôte réservoir des Henipavirus et les connaissances déjà rapportées sont assez éparses. Cela freine considérablement l'avancée de la recherche sur ces virus. Le deuxième objectif de cette thèse est donc, dans un premier temps, de faire un état des lieux des connaissances disponibles sur l'immunité innée des *Pteropodidae* et dans un second temps, d'amorcer la création d'un certain nombre d'outils *in vitro* pour l'étude de l'infection de NiV chez son hôte naturel. Le temps nécessaire à la réalisation de cet objectif dépasse de loin celui qui est imparti à une thèse. Cet objectif permettra donc de dégager de nouveaux axes de recherches, ce qui ne manquera pas de donner de la pérennité à ces travaux.

En outre, la conduite de cette thèse au sein de l'équipe « immunobiologie des infections virales », ainsi que les différents résultats annexes obtenus dans l'exploration des mécanismes mis en évidence dans le cadre du premier objectif, seront l'occasion d'explorer d'autres facettes de l'étude des Henipavirus. La participation et l'intérêt portés aux différentes recherches de l'équipe constituent un objectif, qui bien que moins clairement défini que les autres, contribue grandement à la formation du doctorant.

Afin de répondre à ces objectifs, la partie « RESULTATS » ci-après est divisée en quatre parties. Une première partie s'intéresse à la modultation de la voie canonique de NF-κB par la protéine W de NiV. La seconde partie traite de la modulation de cette même voie par la protéine V. Compte-tenu de l'importance de la localisation cellulaire de W pour ses effets fonctionnels, une troisième partie apporte des détails sur les mécanismes du trafic nuclécytoplasmique de W. Ensemble, ces trois premières parties permettent de traiter le premier objectif. Une quatrième partie intitulée « DEVELOPPEMENT D'OUTILS *in vitro* POUR L'ETUDE DE L'HOTE NATUREL DE NiV ET RESULTATS PRELIMINAIRES » s'attache à répondre au deuxième objectif de cette thèse. L'ensemble des résultats présentés dans ces quatres parties est discuté et mis en perspective dans la partie « DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ». Enfin, les ANNEXES situées à la fin de ce manuscrit apportent un complément d'informations sur les résultats obtenus et présentent les travaux réalisés en parallèle du sujet de cette thèse.

2ème PARTIE : RESULTATS

I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W

A. Introduction

Les PNS de NiV sont des facteurs de virulence et leur rôle *in vivo* a été exploré. Ainsi, W détermine la course du virus dans l'hôte (Satterfield et al. 2015). *In vitro*, W inhibe la voie de production des interférons de type 1 activée via TLR3 (Shaw et al. 2005), ainsi que la voie JAK/STAT (Shaw et al. 2004 ; Ciancanelli et al. 2009). W inhibe également un large ensemble de cytokines et de chimiokines (Lo et al. 2010 ; Satterfield et al. 2015). Mais à ce jour, aucun mécanisme n'explique l'effet de W sur la production de cytokines. L'effet de W serait dépendant de sa localisation nucléaire (Shaw et al. 2005) et son absence d'effet dans certains types cellulaires serait corrélée à une localisation cytoplasmique (Lo et al. 2010).

NF-κB est une famille de facteurs de transcription (p65, p50, cRel, p52 et RelB) et sont les principaux régulateurs de la réponse inflammatoire. Ils se lient aux sites κB de différents gènes pour les réguler. Les gènes des cytokines inhibées par W ont tous un site κB dans leur enhancer et/ou leur promoteur (« NF-κB Target Genes » NF-kB Transcription Factors | Boston University » 2017) et pour la plupart, il a été confirmé qu'elles sont régulées par la voie NF-κB (IL-8 (Kang et al. 2007), CCL2 (Xing et Remick 2007), CCL5 (Wickremasinghe et al. 2004), CXCL10 (Shultz et al. 2007), etc…). Du fait de son effet sur la production de ces cytokines, nous avons émis l'hypothèse que la protéine W de NiV pourrait moduler la voie NF-κB. Dans cette partie, un effet fonctionnel de la protéine W sur la voie NF-κB a été mis en évidence. Une attention particulière a été portée au mécanisme d'action et à l'importance de sa localisation cellulaire. Enfin, l'effet de NiV sur la voie NF-κB en contexte d'infection a été exploré, ainsi que l'implication de W dans cet effet.

B. Matériel and méthodes

1. Culture cellulaire

Les cellules HeLa et A549 ont été cultivées dans du milieu DMEM + GlutaMAX (Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (30 min at 56°C), 10 mM d'HEPES (Life Technologies) et de 20 µg/mL Gentamicin (Life Technologies) à 37°C et 5% CO2. Les cellules HEK293T cells portant le transgène NF-κB_luc (gène rapporteur luciférase Firefly) ont été cultivées dans le même milieu, mais supplémenté avec 200 µg/ml d'Hygromycine (Hygromycin B Gold from InvivoGen) et ont déjà été décrites (Pène et al. 2014).

2. Construction des plasmides

Le gène rapporteur luciférase Firefly pGL3-NFκBx5_luc (portant cinq répétitions de la séquence κB GGGACTTTCC dans son promoteur) a déjà été décrit (Journo et al. 2013) et est un don de Renaud Mahieux. Puisque les promoteurs et enhanceurs peuvent être perturbés par l'activité de la voie NF-κB (Brown et al. 2015), le plasmide pRL-Null codant pour la luciférase Renilla sous le contrôle d'un promoteur minimal (Promega) a été utilisé pour normaliser l'efficacité de la transfection dans chaque puits.

Les plasmides d'expression ont été construits en clonant les séquences codantes des protéines d'intérêt, obtenues par PCR, dans un plasmide pCG par recombinaison grâce au système InFusion (Clontech). Notre vecteur pCG contient soit une étiquette HA soit une étiquette Flag, en aval d'un codon d'initiation de la traduction associé à une séquence Kozak (GCCACCATG). Un linker GlyGlyGlySerGly (séquence GGTGGAGGATCCGGA) a été intégré en aval du tag pour permettre la digestion et la linéarisation du vecteur pCG par l'enzyme AccIII. Les protéines V et W de NiV (numéro d'accession AF376747) ont été clonées dans le plasmide pCG-Flag et les séquences des protéines TRAF6 (numéro d'accession NM_145803.2), IKKβ (numéro d'accession NM_001556.2) et p65 (numéro d'accession NM_021975.3) ont été clonées dans le vecteur pCG-HA. Le plasmide codant pour P/V/W(NTD) a été construit pour exprimer la partie 1 à 407 commune à P, V et W, étiquetée Flag à son extrémité N-terminale et liée à la mCherry à son extrémité C-terminale. Le plasmide codant pour V(CTD) a été construit pour exprimer la partie 408 à 456 spécifique de V, étiquetée Flag et liée à la mCherry à son extrémité N-terminale. Le plasmide codant pour W(CTD) a été construit pour exprimer la partie 408 à 450 spécifique de W, également étiquetée Flag et liée à la mCherry à son extrémité N-terminale. Le plasmide codant pour WmNLS (mutée pour le NLS du CTD) a été construit pour exprimer la W étiquetée Flag et mutée pour les résidus K430A, K440A et R442A, comme déjà décrit (Shaw et al. 2005). Les plasmides codant pour VmNES et WmNES (mutées pour le NES du NTD) ont été construits pour exprimer la V et la W étiquetées Flag et mutées pour les résidus L174A et L186A, comme déjà décrit (Rodriguez et al. 2004). La même stratégie a été utilisée pour construire le plasmide codant pour la protéine WmNESmNLS, mutée à la fois pour le NES et le NLS. Le plasmide codant pour WmSTAT (incapable de lier STAT1) a été construit pour exprimer la W étiquetée Flag et mutée pour le résidu G121E, comme déjà décrit (Ciancanelli et al. 2009). Toutes les séquences codantes insérées dans le vecteur pCG ont été vérifiées par séquençage, les stocks de plasmides ont été produits en utilisant un kit limitant la présence d'endotoxines bactériennes (NucleoBond®Xtra Midi EF, Macherey-Nagel) et le profil d'expression des protéines produites a été vérifié par western-blot.

3. Western-blots

Des cellules HeLa ont été ensemencées dans des plaques 12 puits à raison de $2{,}5.10^5$ cellules par puits. 20h après, les cellules ont été transfectées avec 1 µg total de différents plasmides en utilisant du JetPrime (Polyplus) selon les recommandations du fabricant. 5h

après transfection, le milieu a été changé et les cellules replacées dans l'étuve pour 15h supplémentaires. 20h après transfection, les cellules ont été lysées dans 100 µl de tampon de lyse (50 mM Tris HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1X Complete protease inhibitor (Roche)). Les lysats cellulaires ont été incubés pendant 20 minutes sur glace et centrifugés à 15000 xg, pendant 15 minutes à 4°C. 100 µl de surnageant ont été récupérés, auxquels ont été ajoutés 20 µl de tampon de charge 6X (0.35 M Tris HCl [pH 6.8], 10.3% SDS, 36% glycerol, 0.6 M DTT ou 5% β-mercaptoéthanol, 0.012% bromophenol blue), avant d'être chauffés pendant 3 minutes à 100°C. Les protéines des lysats ont ensuite été séparées par SDS-PAGE sur gel à 12% polyacrylamide. Pour optimiser l'efficacité des transferts sur les membranes, le SDS a été supprimé des gels (le SDS présent était celui du tampon de charge). Les protéines séparées sur gels ont ensuite été électrotransferrées pendant la nuit à 4°C et 50 mA sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) (Amersham Biosciences Hybond-P). Les membranes PVDF ont été saturées pendant 1h avec une solution saline de Tris contenant 0.05% de Tween 20 (TBS-T) et 5% de lait. Elles ont ensuite été incubée pendant 2h avec différents anticorps primaires dilués de 1/500 à 1/2000 dans du TBS-T + 5% milk : anticorps de souris anti-Flag (Sigma F1804), anti-GAPDH (Chemicon MAB374), anti-HA (Sigma H3663) et anticorps de lapin anti-14-3-3 (pan) (Cell Signaling 8312). Les membranes PVDF ont ensuite été lavées 5 fois dans du TBS-T et incubées pour 1h supplémentaire avec des anticorps anti-souris ou anti-lapin couplés avec la péroxidase de raifort (Promega W4021 et W4011, dilués au 1/5000 dans du TBS-T + 1% milk). Les membranes PVDF ont ensuite été lavées 6 fois dans du TBS-T, incubées avec du Covalight reagent (Covalab) ou du SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFischer Scientific), avant que la chimioluminescence soit mesurée avec le système d'imagerie VersaDoc Imaging System (Bio-Rad).

4. Tests fonctionnels en contexte de transfection

Les plaques 96 puits ont été préalablement incubées pendant 1h à 37°C avec 50 µg/ml de poly-D-lysine, puis rincées avec de l'eau (Versol) et séchées. $1{,}5.10^4$ cellules HeLa ou 2.10^4 cellules A549 par puits ont été ensemencées dans les plaques. 20h après, les cellules ont été transfectées avec 10 ng du gène rapporteur pGL3-NFκBx5_luc, 5 ng de pRL-Null pour la normalisation et 200 ng total de différents plasmides en utilisant du JetPrime (Polyplus) selon les recommandations du fabricant : 150 ng de plasmides codant les PNS de NiV et 50 ng codant les protéines MDA5, MAVS, TRAF6, IKKβ et p65 ont été transfectés par puits (dans le cas des conditions contrôlées ou pour normaliser la quantité de plasmides entre les puits, un vecteur vide (EV) a été utilisé pour atteindre 200 ng de plasmides par puits). 5h après transfection, le milieu a été changé et les cellules replacées dans l'étuve pour 15h supplémentaires. 20h après transfection, selon les conditions, les cellules ont pu être traitées avec 10 ng/ml d'IL-1β ou de TNFα (PeproTech) pendant 4h. La révélation des luciférases Firefly et Renilla a été réalisée en utilisant le kit Dual-Glo Luciferase Assay system (Promega E2920), selon les recommandations du fabricant. La luminescence de chaque luciférase a été mesurée par une acquisition de 10 secondes par puits en utilisant un lecteur de microplaque (Berthold Mithras LB940). Pour chaque puits, la luminescence dépendante de NF-κB a été obtenue en faisant le ratio entre le

signal de la luciférase Firefly et celui de la Renilla. Chaque condition a été réalisée en triplicat et répétée au moins 3 fois.

7. Co-immunoprécipitations

5×10^5 cellules HeLa par puits ont été ensemencées dans des plaques 6 puits. 20h après ensemencement, les cellules ont été transfectées avec un total de 2 µg de différents plasmides (vecteur vide ou codant pour les protéines étiquetées Flag V ou W) à l'aide de JetPrime (Polyplus), selon les recommandations du fabriquant. 5h après transfection, le milieu a été changé et les cellules ont été replacées à l'étuve (à 37°C, 5% de CO_2) pour 15h supplémentaires. 20h après transfection, les cellules ont été lysées dans 200 µl de buffer de lyse (50 mM Tris HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40, 50 mM NaF, 2 mM Na3VO4, 5% glycerol, 1X Complete protease inhibitor (Roche)), incubées 20 minutes sur glace et centrifugées pendant 15 min à +4°C à 15000g. Le surnageant de lyse a été incubé à +4°C pendant 2h en présence de billes magnétiques couplées à des anticorps anti-Flag (Sigma M8823). Les billes ont ensuite été lavées dans un tampon de lavage (50 mM Tris HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% NP40, 50 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4, 5% glycerol, 1X Complete protease inhibitor (Roche)) et les protéines étiquetées Flag ont été éluées pendant 1 heure à température ambiante avec 50 µl de tampon de lavage contenant 240 ng/µl de peptide 3xFlag (Sigma F4799). Pour chaque condition, 50 µl d'éluat ont été récupérés et 10 µl de tampon de charge (0.35 M Tris HCl [pH 6.8], 10.3% SDS, 36% glycerol, 0.6 M DTT, 0.012% bromophenol blue) ont été ajoutés. Ces échantillons ont ensuite été chauffés pendant 3 min à 100°C. La présence de différentes protéines, ainsi que leur niveau d'expression, ont été évalués par western-blot.

5. Immunofluorescences

Des lamelles ont été préalablement stérilisées avec de l'éthanol, lavées dans du PBS et déposées au fond de puits de plaques 6 puits. 3.10^5 cellules par puits ont été ensemencées dans les plaques. 20h après, les cellules ont été transfectées avec 2 µg d'ADN de différents plasmides en utilisant du JetPrime (Polyplus) selon les recommandations du fabricant. 5h après transfection, le milieu a été changé et les cellules replacées dans l'étuve pour 15h supplémentaires. 20h après transfection, les lamelles ont été lavées une fois avec du PBS les cellules ont été fixées avec 3.7% de formaldéhyde pendant 20 minutes. Les lamelles ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS, les cellules perméabilisées avec du PBS + 0.5% Triton pendant 5 minutes et à nouveau lavées trois fois avec du PBS. Les lamelles ont été saturées dans du PBS + 5% lait + 0.1% Triton pendant 30 minutes, puis lavées 3 fois dans du PBS et incubées pendant 1h avec différents anticorps primaires dilués de 1/50 à 1/200 dans du PBS + 5% lait + 0.1% Triton : anticorps de souris anti-Flag (Sigma F1804) et anticorps de lapin anti-14-3-3 (pan) (Cell Signaling 8312) selon les conditions. Après trois lavages au PBS, les lamelles ont été incubées pendant 45 minutes avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé Alexa 488 (Invitrogen A11034) ou anti-souris couplé Alexa 555 (Invitrogen A31570) dilués à 1/500 dans

du PBS + 5% lait + 0.1% Triton. Les noyaux ont été marqués avec du DAPI (ThermoFisher 62248) dilué avec les anticorps secondaires. Les lamelles ont été lavées 4 fois avec du PBS, montées sur lame avec du Fluoprep (Biomérieux) et scellées à l'aide de vernis transparent. Les lames ont été analysées en utilisant un microscope confocal (Leica TCS SP5).

8. Tests fonctionnels en contexte d'infection

Le virus Nipah recombinant (de l'isolat UMMC1; numéro d'accession Gen-Bank AY029767) (rNiV WT), le recombinant déficient pour la partie C-terminale spécifique de W (rNiV W(CTD)ko) et le recombinant exprimant l'eGFP (rNiV-eGFP) ont été préalablement décrits (Yoneda et al. 2006, 2010). Les infections virales ont été réalisées au laboratoire P4 Jean Mérieux de Lyon, France.

Les plaques 96 puits ont été préalablement incubées pendant 1h à 37°C avec 50 µg/ml, puis rincées avec de l'eau (Versol) et séchées. 2.10^4 cellules HEK293T (NF-κB_luc) par puits ont été ensemencées dans les plaques. 20h après, les cellules ont été infectées avec du DMEM 0% contenant les dilutions appropriées de NiV WT, rNiV W(CTD)ko ou rNiV-eGFP pour une MOI de 3, à 37°C et 5% de CO_2. Les cellules non infectées (Mock) ont été incubées avec du DMEM 0%. A 1h30 après infection, le milieu a été remplacé par du DMEM 10% supplémenté avec 200 µg/ml d'Hygromycine (Hygromycin B Gold, InvivoGen) et 1 µM de peptide inhibiteur de fusion (peptide VIKI-PEG4-chol, déjà décrit (Porotto et al. 2010)). Les cellules ont été cultivées à 37°C et 5% de CO_2 pour 15h supplémentaires. 20h après infection, la fluorescence des cellules infectées avec rNiV eGFP a été évaluée. 20h après infection, selon les conditions, les cellules ont été traitées avec 10 ng/ml de TNFα (PeproTech) pendant 4h. Ensuite, les cellules ont été lysées en utilisant le tampon de lyse du kit Luciferase Assay System (Promega E1501) et la révélation de la luciférase Firefly a été réalisée selon les recommandations du fabricant. La luminescence de la luciférase Firefly a été mesurée par une acquisition de 15 secondes par puits en utilisant un lecteur de microplaque (Tecan Infinite 200 Pro). Chaque condition a été réalisée en triplicat et répétée 4 fois. Les répétitions ont été normalisées entre elles en utilisant le contrôle négatif non stimulé. Les résultats présentés sont les moyennes des triplicats de chaque répétition normalisée. Le contenu lysé des puits a été récupéré pour estimer la quantité des protéines cellulaires (avec un anticorps anti-GAPDH (Chemicon MAB374)) et virales (avec les anticorps anti-P/V/W(NTD) et anti-W(CTD) déjà décrits (Kulkarni et al. 2009)) par western-blot.

10. Analyse des résultats

Les histogrammes des tests fonctionnels représentent les moyennes de chaque condition + SD. Pour les analyses statistiques des tests fonctionnels, l'unité expérimentale est le puits et le seuil de significativité a été placé à 5%. « * » représente une $p < 0,05$, « ** » représente une $p < 0,01$, « *** » représente une $p < 0,001$ et « **** » représente une $p < 0,0001$.

Pour les **Figures 1, 3, 4** et **6**, les distributions normales de l'ensemble des valeurs des triplicats des différentes répétitions pour chaque condition ont été testées à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk. Les valeurs des différentes plaques ont été normalisées entre elles et les triplicats de chaque condition d'une même plaque ont été moyennés. Pour les **Figures 1** et **4**, les différentes conditions ont été comparées au contrôle positif à l'aide du test de Student si la normalité était assumée (avec correction en cas de non homoscedasticité) ou sinon à l'aide du test de rang de Mann-Whitney.

Pour les **Figures 3 et 6**, les triplicats de chaque condition d'une même plaque ont été moyennés et les rapports (conditions / témoin positif) ont été comparés entre eux à l'aide d'une ANOVA si la normalité et l'homoscedasticité étaient assumées (la distribution normale des résidus a été vérifiée à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk et l'homoscedasticité par un test de Bartlett). Un test de Tukey de comparaisons multiples a été utilisé pour comparer les conditions deux à deux.

C. Résultats

1. La protéine W inhibe la voie NF-κB via son CTD spécifique

Dans nos conditions expérimentales, les cellules HeLa présentent un taux de transfection d'environ 90%. Le plasmide codant pour la protéine W a été transfecté avec un gène rapporteur NF-κB_luc afin d'évaluer l'activation de la voie NF-κB dans des cellules HeLa. D'après les contrôles positifs (**Figures 1A** et **1B**), la voie de NF-κB est fonctionnelle dans ces cellules et activable à la fois par stimulations avec IL-1β et avec TNFα, qui induisent respectivement un signal ≈ 25 fois et 17 fois plus élevé que le niveau basal d'activation de la voie. Dans les cellules non stimulées, W diminue le niveau basal d'activation de la voie NF-κB ($p = 0,0168$) (**Figures 1A**). W présente également un effet inhibiteur de la voie quand les cellules sont stimulées avec de l'IL-1β ou du TNFα ($p < 0,0001$ et $p = 0,0001$ respectivement).

Les troncatures étiquetées Flag correspondant au NTD de W (1-407) commun à P et V, et à son CTD spécifique (408-450) ont été fusionnées à la mCherry. La mCherry a été placée en C-ter et en N-ter pour les constructions W(NTD) et W(CTD) respectivement. Cela a permis d'augmenter la masse moléculaire de la protéine ainsi obtenue pour détection par western-blot et de les visualiser directement par immunofluorescence. Pour évaluer les effets de ces troncatures, la mCherry seule a été utilisée comme contrôle. Quand la voie NF-κB est activée avec de l'IL-1β, le NTD de W n'a pas d'effet inhibiteur (**Figures 1A**). A l'inverse, dans les mêmes conditions de stimulation, le CTD de W inhibe fortement la voie NF-κB ($p = 0,0022$).

Afin de déterminer l'étape de la voie de NF-κB affectée par W, les cellules ont été stimulées par transfection de différents plasmides codant pour des effecteurs de la voie canonique : TRAF6, IKKβ et p65. Les stimulations avec IL-1β et TNFα ont également été réalisées comme contrôles. La protéine W inhibe fortement la voie activée par TRAF6 ($p < 0,0001$) ou IKKβ ($p < 0,0001$), mais elle est sans effet après activation par surexpression de p65, suggérant que l'étape ciblée est en amont de p65 (**Figure 1B**).

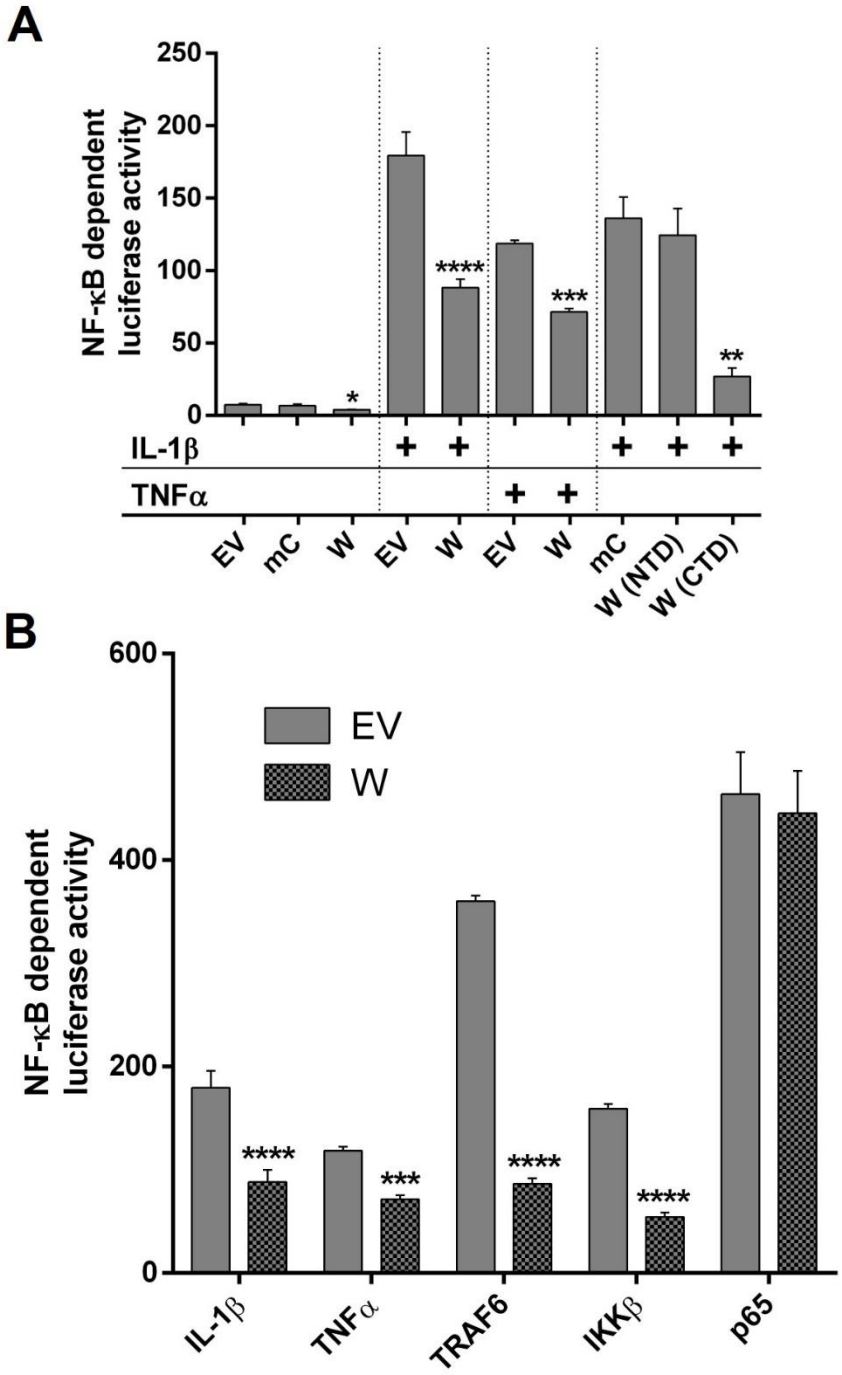


Figure 1 : *Détails sur l'effet de W sur la voie NF-κB.* ***A :*** *Des cellules HeLa ont été transfectées avec un gène rapporteur NF-κB_luc Firefly et un plasmide luciférase Renilla pRL-Null (pour la normalisation). Les cellules ont également été transfectées soit avec un vecteur vide (EV, utilisé comme contrôle) soit avec des plasmides codant pour les protéines W ou ses troncatures couplées à la mCherry (mC) ou la mCherry seule (utilisée comme contrôle des troncatures). 20h après transfection, les cellules ont été traitées avec de l'IL-1ß ou TNFα, à 10 ng/ml pendant 4h, puis la luminescence a été évaluée. Pour chaque stimulation, la condition, où les protéines virales ont été exprimées (W ou troncatures), a été comparée au contrôle (EV ou mC) correspondant.* ***B :*** *Mêmes conditions que A, mais pour la stimulation, les cellules ont été transfectées avec des plasmides codant pour les protéines TRAF6, IKKß ou p65, ou traitées 20h après transfection avec de l'IL-1ß ou TNFα (à 10 ng/µl) pendant 4h. La luminescence a ensuite été évaluées. Pour chaque stimulation, la condition, où la protéine W a été exprimée, a été comparée au contrôle (EV) correspondant.*

2. La localisation nucléaire de W est nécessaire pour inhiber la voie NF-κB, mais pas son interaction avec STAT1

Tableau 1 : *Récapitulatif des résultats des tests statistiques. Pour chaque stimulation, au moins une condition était significativement différente des autres (p < 0,0001 pour la stimulation IL-1β et p = 0,0001 pour la stimulation TRAF6 (ANOVA)). Un test de Tukey de comparaisons multiples a été réalisé pour comparer les conditions deux à deux (ns = non significatif). Les données pour V et VmNES n'ont pas été intégrées aux tests statistiques du fait de la non normalité des résidus.*

Comparaison entre		**Stimulation**	
		IL-1β	**TRAF6**
W	WmNES	ns	ns
W	WmNLS	**	***
W	WmNESmNLS	*	ns
W	WmSTAT	ns	
WmNES	WmNLS	***	***
WmNES	WmNESmNLS	**	ns
WmNLS	WmNESmNLS	ns	***
WmSTAT	WmNES	ns	
WmSTAT	WmNLS	***	
WmSTAT	WmNESmNLS	*	

Le rôle de la localisation nucléaire de W dans son effet inhibiteur a été étudié. La protéine W, visible dans le cytoplasme, se localise majoritairement dans le noyau (**Figure 2**, condition **W**). La mutation du NLS précédemment décrite (Shaw et al. 2005) s'accompagne d'une relocalisation cytoplasmique quasi exclusive (**Figure 2**, condition **WmNLS**). Inversement, la mutation de son NES (Rodriguez et al. 2004) entraîne une distribution quasi exclusivement nucléaire (**Figure 2**, condition **WmNES**). Si le NES du NTD et le NLS du CTD sont mutés conjointement, la protéine WmNESmNLS présente une localisation cytoplasmique et nucléaire (**Figure 2**, condition **WmNLS**). Donc malgré l'absence de son NLS, elle peut entrer dans le noyau. Cela suggère l'existence d'un autre NLS car sa masse moléculaire est supérieure à 40 kD (Swanson et McNeil 1987).

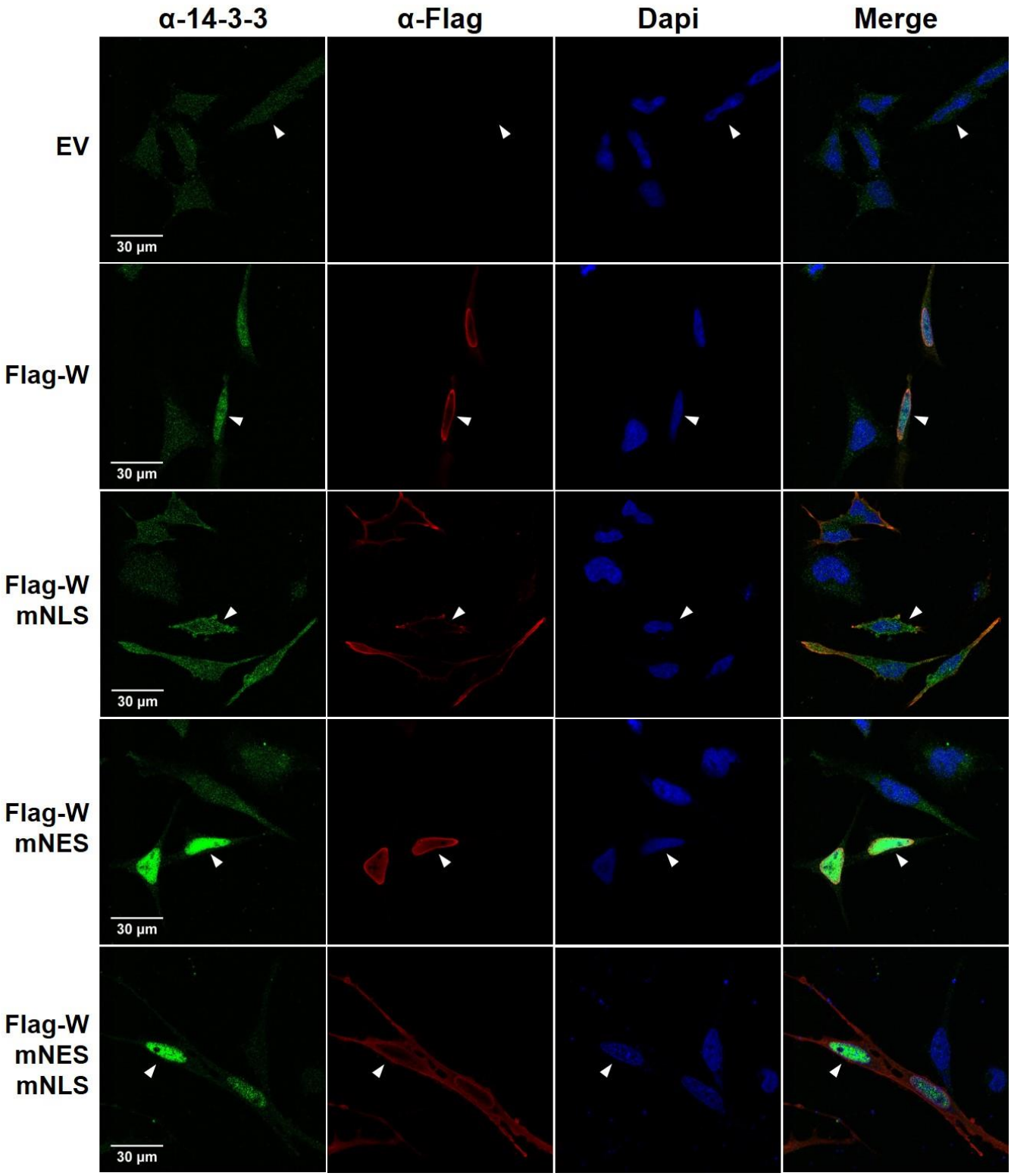


Figure 2 : *Effet de la protéine W sur la localisation cellulaire des protéines 14-3-3 en fonction de la localisation cellulaire de W. Des plasmides codant pour les protéines W, WmNLS, WmLS, WmNESmNLS ou un vecteur vide (EV, utilisé comme contrôle) ont été transfectés dans des cellules HeLa. 20h après transfection, les cellules ont été fixées et perméabilisées. Les protéines ont été marquées avec un anticorps de souris anti-Flag et un anticorps de lapin spécifique anti-14-3-3. Elles ont ensuite été marquées avec des anticorps anti-souris et anti-lapin Alexa 555 et Alexa 488 respectivement. Les noyaux ont été marqués avec du Dapi. Les images présentées ont été réalisées avec l'objectif x63 et sont représentatives des photos obtenues pour chaque condition. Les flèches blanches indiquent les résultats d'intérêt et la barre en bas à gauche indique l'échelle.*

La protéine WmNES majoritairement nucléaire a un effet inhibiteur de la voie de NF-κB activée par IL-1β qui n'est pas statistiquement différent de celui de W (**Figure 3A**). A l'inverse, les protéines WmNLS et WmNESmNLS ont un effet inhibiteur plus faible. Quand la voie est activée par TRAF6, le profil d'inhibition de WmNES est semblable à celui sous stimulation IL-1β (**Figure 3B**). Sous stimulation avec TRAF6, WmNLS perd complètement son effet inhibiteur. A l'inverse, WmNESmNLS conserve un effet inhibiteur de la voie, non différent de celui de W. Ainsi les mutants de W, pouvant entrer dans le noyau (WmNES et WmNESmNLS), gardent au moins partiellement leur effet inhibiteur, contrairement au mutant cytoplasmique WmNLS. Les résultats des tests statistiques sont récapitulés dans le **Tableau 1**. Les profils d'inhibition de W et WmNLS sur la voie NF-κB activée par IL-1β, TNFα et TRAF6 en cellules A549 sont similaires à ceux observés en cellules HeLa (**Figure 4B**). W inhibe significativement la voie NF-κB quand elle est stimulée par IL-1β ($p = 0,0002$), TNFα ($p = 0,007$) et TRAF6 ($p = 0,003$). WmNLS inhibe aussi la voie NF-κB activée par IL-1β et TRAF6 ($p = 0,02$ et $p = 0,0173$ respectivement).

La protéine W interagit avec STAT1 pour la séquestrer dans le noyau (Shaw et al. 2004). Afin de déterminer si cette interaction de W est impliquée dans son effet inhibiteur, l'effet sur la voie NF-κB d'un mutant de W (WmSTAT), précédemment décrit pour ne pas interagir avec STAT1 (Michael J. Ciancanelli et al. 2009), a été évalué. WmSTAT conserve le même effet inhibiteur de la voie de NF-κB activée par IL-1β, que celui observé par la forme parentale W (**Figure 3A**).

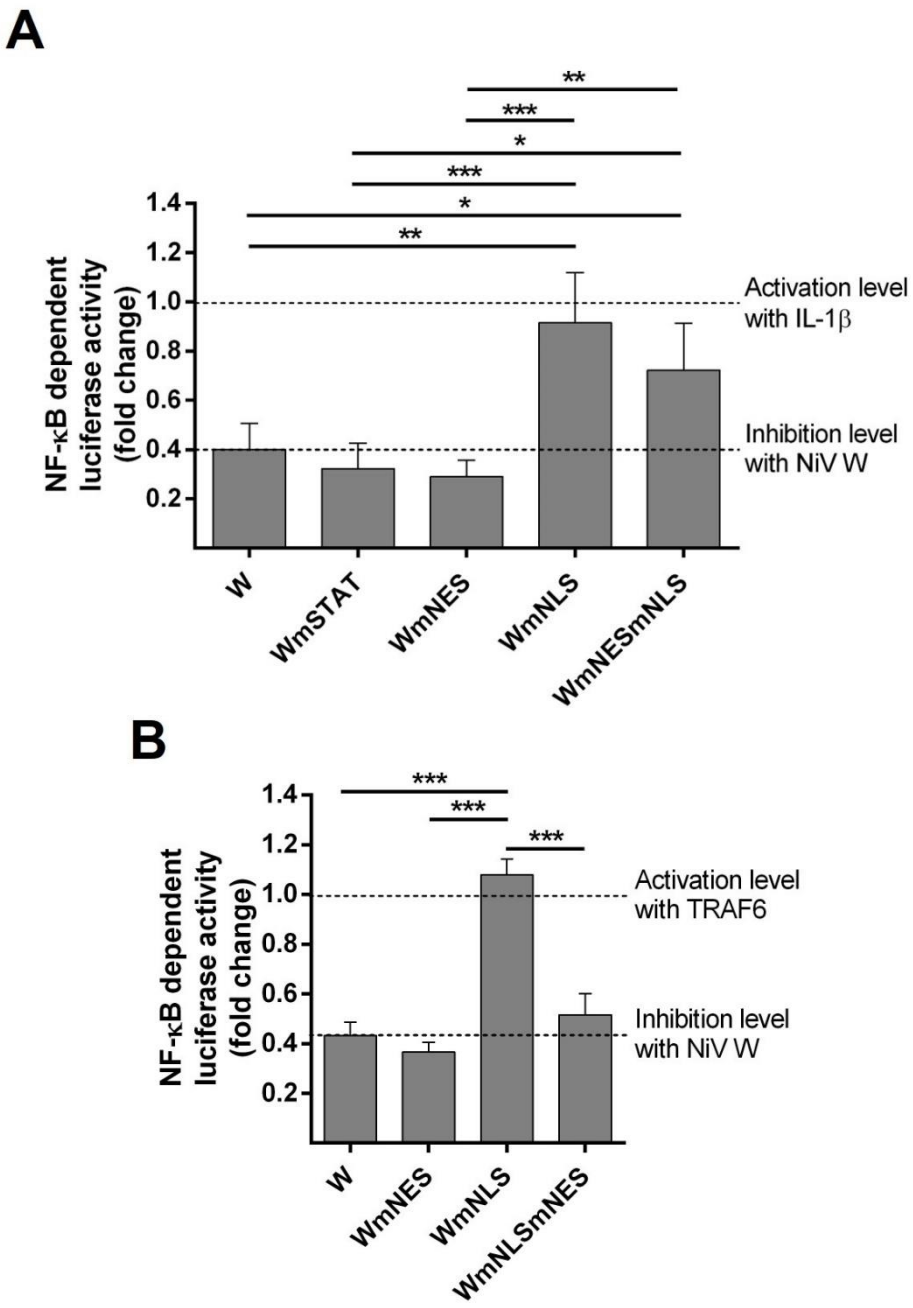


Figure 3 : *Importance de la localisation cellulaire de W et de son interaction avec STAT1 pour son effet sur la voie NF-κB.* ***A :*** *Des cellules HeLa ont été transfectées avec un gène rapporteur NF-κB_luc Firefly et un plasmide luciférase Renilla pRL-Null (pour la normalisation). Les cellules ont également été transfectées soit avec un vecteur vide soit avec des plasmides permettant l'expression de protéines étiquetées Flag. 20h après transfection, les cellules ont été traitées avec de l'IL-1ß à 10 ng/ml pendant 4h, puis la luminescence a été évaluée. Pour chaque condition, le résultat présenté est le ratio du signal de la condition testée sur le signal du contrôle positif (stimulé IL-1ß).* ***B :*** *Mêmes conditions que A, mais pour la stimulation, les cellules ont été transfectées avec le plasmide codant pour TRAF6.*

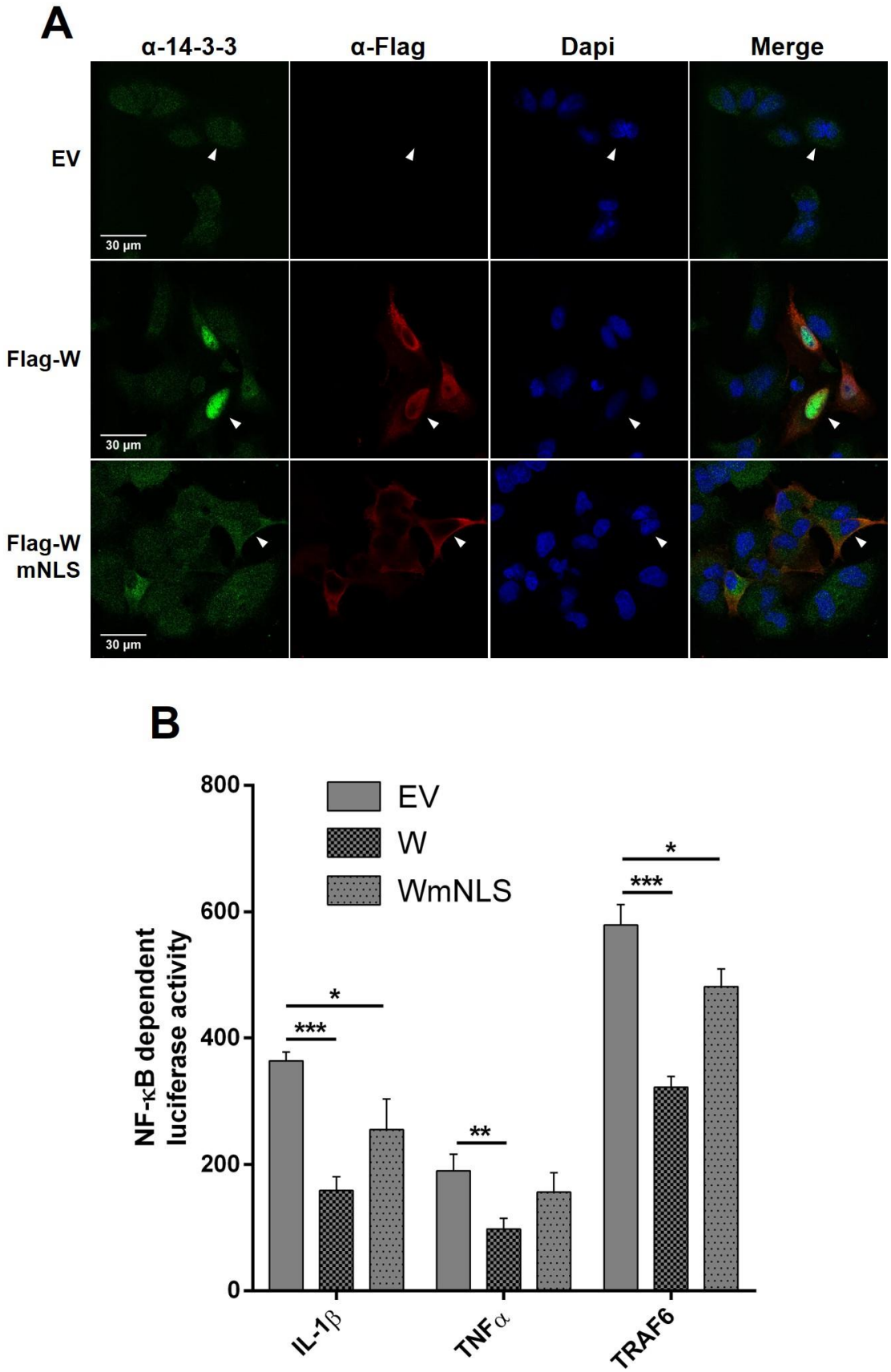


Figure 4 : *Effet de la protéine W sur la voie NF-κB et sur la localisation cellulaire des protéines 14-3-3 en fonction de la localisation cellulaire de W en cellules A549.* ***A :*** *Mêmes conditions que la figure 5.* ***B :*** *Mêmes conditions que la Figure 2D.*

3. W co-immunoprécipite avec 14-3-3 et entraîne sa redistribution dans le noyau

Des résultats précédemment obtenus (voir « ANNEXE 1 : EXPLORATION DES PARTENARIATS CELLULAIRES DES PROTEINES V ET W DE NIV ») suggèrent que W interagit avec les protéines de la famille de 14-3-3. Ces protéines sont impliquées dans la régulation des voies de signalisation, y compris la voie canonique d'activation de NF-κB (Schuster et al. 2011 ; Aguilera et al. 2016).

Les protéines endogènes co-immunoprécipitées avec V (utilisée ici comme contrôle) et W étiquetées Flag, ont été récupérées à l'aide de billes magnétiques couplées avec un anticorps anti-Flag. Des protéines de la famille 14-3-3 co-immunoprécipite avec W, mais pas avec V (**Figure 5A**), ce qui est conforme avec les résultats obtenus dans « ANNEXE 1 : EXPLORATION DES PARTENARIATS CELLULAIRES DES PROTEINES V ET W DE NIV ». Quand les protéines endogènes co-immunoprécipitant avec le NTD commun à V et W, et le CTD spécifique de W sont récupérées, les protéines de la famille 14-3-3 ne sont détectées qu'avec le CTD spécifique de W (**Figure 5A**), ce qui est en adéquation avec l'absence de 14-3-3 dans la condition V. Puisque p65 interagit avec les protéines 14-3-3 (Aguilera et al. 2016), le plasmide codant pour la protéine p65 étiquetée HA a été co-transfecté avec celui codant pour la W afin de déterminer l'impact d'une surexpression de p65 sur la co-immunoprécipitation de W et 14-3-3. Dans cette condition, la quantité de protéines 14-3-3 co-immunoprécipitées avec W est diminuée. Afin de mieux mettre en évidence cette diminution, les intensités de marquage des protéines 14-3-3 ont été évaluées et normalisées par les intensités de marquage de la protéine W récupérée sur les billes dans les conditions avec ou sans p65. Une quantité plus importante de 14-3-3 co-immunoprécipite avec W exprimée seule par rapport à la condition où W est co-exprimée avec p65 (**Figure 5B**).

La distribution des protéines de la famille de 14-3-3 a été déterminée par immunofluorescence. En cellules HeLa, les protéines 14-3-3 sont faiblement exprimées et semblent se distribuer à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau de façon uniforme (**Figure 2** condition **EV**). Mais quand la W nucléaire est exprimée dans la cellule, les protéines 14-3-3 se concentrent dans le noyau (**Figure 2** condition **W**). Quand WmNLS, mutant quasi exclusivement cytoplasmique est exprimée, les protéines 14-3-3 ne se concentrent pas dans le noyau (**Figure 2** condition **WmNLS**). Quand WmNES, mutant quasi exclusivement nucléaire est exprimée, les protéines 14-3-3 sont localisées quasi exclusivement dans le noyau (**Figure 2** condition **WmNES**). Quand W est mutée à la fois pour son NES et le NLS du CTD et se localise dans le noyau et le cytoplasme (possiblement grâce à un deuxième NLS), les protéines 14-3-3 se concentrent dans le noyau d'une façon similaire à la condition où la W parentale est exprimée (**Figure 2** condition **WmNESmNLS**). Ainsi la localisation nucléaire de 14-3-3 observée en présence de W est dépendante de la localisation nucléaire de W, mais indépendante des acides aminés mutés pour relocaliser W.

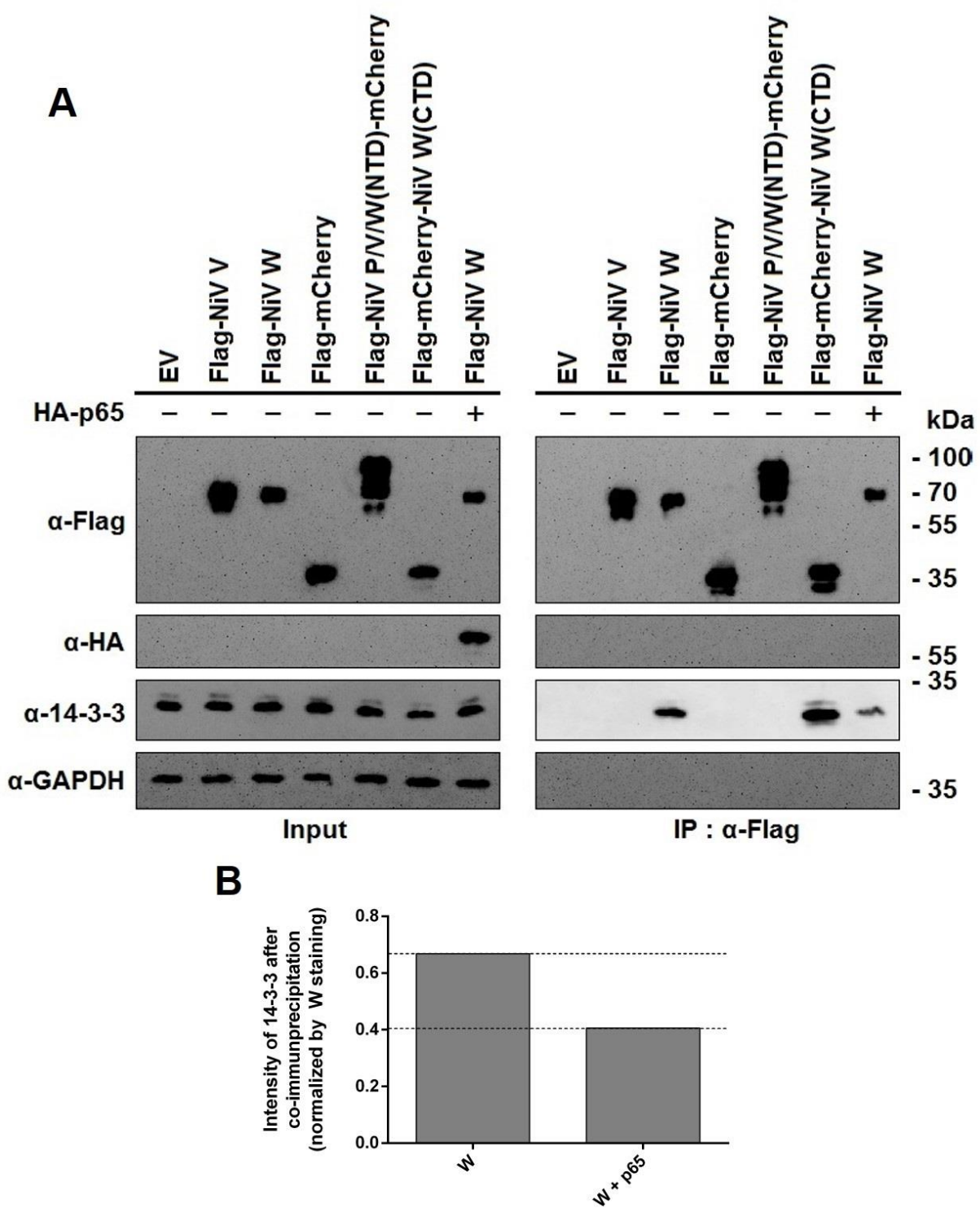


Figure 5 : *Interaction de la protéine W avec les protéines 14-3-3.* ***A :*** *les plasmides codant pour les protéines V, W, mCherry et les NTD et CTD de W étiquetés Flag ou p65 étiquetée HA ont été transfectés dans des cellules HeLa selon les conditions. Un vecteur vide (EV) a été utilisé comme contrôle. Après co-immunoprécipitation grâce à des billes magnétiques couplées avec des anticorps anti-Flag, les protéines virales et les protéines 14-3-3 endogènes ont été détectées par western-blot. La colonne de gauche montre les protéines présentes dans le lysat cellulaire. La colonne de droite montre les protéines présentes après co-immunoprécipitation. B : L'intensité du marquage des protéines 14-3-3 endogènes après co-immunoprécipitation, de la figure présentée en A, a été évaluée pour les conditions indiquées. L'intensité du marquage a été normalisée avec l'intensité du marquage de la W immunoprécipitée.*

Des résultats similaires ont été obtenus en cellules A549 (**Figure 4A**). Dans la condition où WmNES est exprimée en cellules A549, 14-3-3 ne se concentre pas dans le noyau, mais ne se distribue pas dans la cellule de façon similaire à la condition EV (**Figure 4A conditions EV** et **WmNLS**) : alors que WmNLS est exclue du noyau, les protéines 14-3-3 sont aussi exclues du noyau, confortant l'hypothèse d'une interaction entre W et les protéines 14-3-3 déjà suggérée par co-immunoprécipitation.

4. Le CTD de W est impliqué dans l'inhibition de la voie NF-κB par NiV en contexte d'infection

Afin de déterminer si la protéine W est impliquée dans l'inhibition de la voie NF-κB en contexte d'infection, le même gène rapporteur a été utilisé, intégré dans des cellules HEK293T (déjà décrites (Pène et al. 2014)), pour ne pas activer les voies de signalisation de l'immunité innée avant l'entrée de NiV, via la transfection. En premier lieu, l'infection de ces cellules avec un NiV recombinant exprimant l'eGFP a permis de déterminer leur susceptibilité à l'infection. 24h après infection à MOI 3, la majorité des cellules HEK293T expriment l'eGFP et sont donc infectées (**Figure 6A**). Ces cellules ont ensuite été infectées avec un NiV recombinant sauvage (rNiV) ou un NiV recombinant déficient pour le CTD de W (rNiV W(CTD)ko) ou non infectées (Mock). Le niveau d'expression des protéines virales a été déterminé par western-blot. Alors que les cellules infectées par les deux virus recombinants expriment des quantités similaires de protéines N, seules les cellules infectées avec rNiV expriment le CTD de W (**Figure 6B**). L'anticorps reconnaissant le NTD commun à P, V et W, permet de marquer ces trois protéines dans les cellules infectées avec rNiV (les protéines V et W ont des masses moléculaires très proches). Après infection avec rNiV W(CTD)ko, P, V et une forme de masse inférieure correspondante à la W tronquée est visible (**Figure 6B**, **astérisque**). Dans les cellules non stimulées, l'activation de la voie NF-κB est réduite dans les cellules infectées par rNiV par rapport aux cellules non infectées ($p < 0,0001$) (**Figure 6C**) et il n'y a pas de différence d'activation de la voie entre la condition infectée avec rNiV et la condition infectée avec rNiV W(CTD)ko. Quand la voie NF-κB est activée par le TNFα, à nouveau l'activation de la voie NF-κB est réduite dans les cellules infectées par rNiV par rapport aux cellules non infectées (**Figure 6D**). NiV inhiberait donc la voie de NF-κB dans les cellules infectées. Mais contrairement à la condition non stimulée, il y a une perte partielle de l'inhibition pour le mutant rNIV W(CTD)ko, sans que le niveau d'activation de la condition Mock ne soit totalement restauré (**Figure 6D**), même si cette différence est statistiquement non significative. L'infection par NiV inhibe donc la voie NF-κB activée ou non par TNFα, mais dans le cas d'une stimulation avec TNFα, l'inhibition de NiV est dépendante, au moins en partie, du CTD spécifique de W. Les résultats obtenus en condition de stimulation par TNFα sont en conformité avec les résultats précédemment présentés en contexte de transfection.

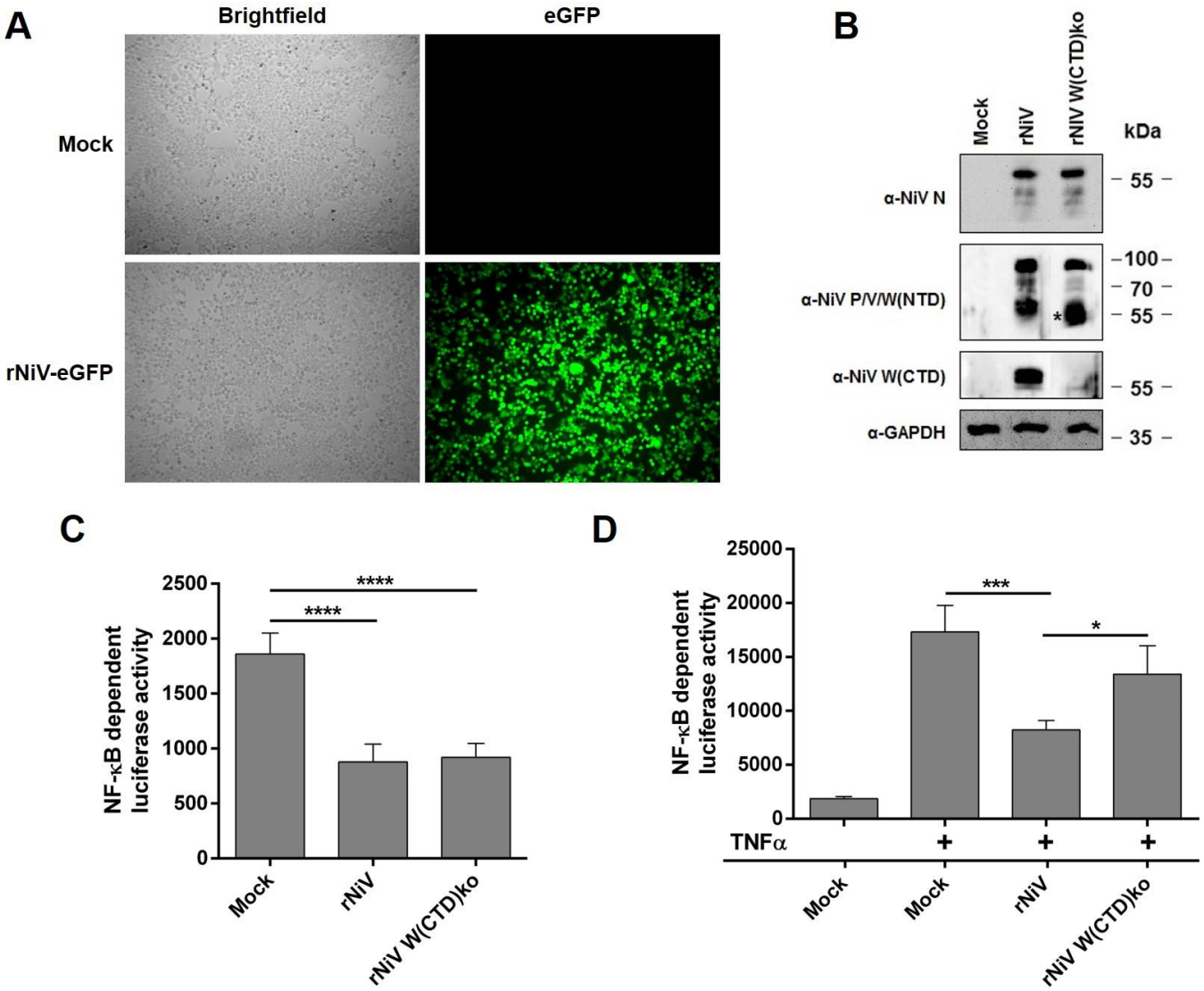


Figure 6 : *Effet de NiV sur la voie NF-κB et implication de la protéine W.* ***A :*** *Pour évaluer la proportion de cellules infectées, la fluorescence a été détectée dans des cellules HEK293T NF-κB_luc non infectées (Mock) ou infectées avec rNiV-eGFP à MOI 3 pendant 24h. Les images présentées ont été réalisées avec l'objectif x 20.* ***B :*** *Dans les mêmes conditions, des cellules non infectées (Mock) ou infectées avec rNiV ou rNiV W(CTD)ko ont été lysées et l'expression de la protéine N (α-NiV N) ou des protéines issues du gène P (en marquant soit le NTD commun avec un anticorps α-NiV P/V/W(NTD) soit le CTD spécifique de W avec un anticorps α-NiV W(CTD)) a été évaluée par western-blot. Pour chaque condition, la quantité de cellules lysées a été évaluée en marquant la GAPDH. « * » indique une protéine de masse moléculaire inférieure à V et W, et correspondant à la protéine W (CTD)ko.* ***C :*** *L'activité de la luciférase dépendante de NF-κB a été évaluée dans des cellules non infectées (Mock) ou infectées avec rNiV ou rNiV W(CTD)ko pendant 24h, à MOI 3. Représentation des 4 répétitions de tests fonctionnels réalisés en triplicat.* ***D :*** *Mêmes conditions que C, mais les cellules ont été stimulées 20h après infection avec du TNFα (10 ng/ml) pendant 4h.*

D. Conclusion de la partie I.

Les sites κB ne sont pas les seuls éléments présents dans les enhancers et les promoteurs des gènes des chimiokines, qui sont régulés par des assemblages de différents facteurs de transcription (Panne et al. 2007). Ainsi, lorsqu'une perturbation de la production de chimiokines est détectée (par qPCR par exemple), il est difficile de déterminer quelle voie de signalisation est modulée. Dans cette étude, un système de gène rapporteur NF-κB (déjà décrit (Journo et al. 2013)) a été choisi pour explorer spécifiquement la modulation de la voie NF-κB. Ce gène rapporteur contient cinq répétitions de la séquence GGGACTTTCC, qui respecte la séquence consensus du site κB déjà décrite : 5'-GGGRNWYYCC-3 ' (où R est une purine, W est une adénine ou une thymine, Y est une pyrimidine et N est n'importe quelle base) (Sen et Baltimore 2006 ; Lenardo et al. 1987).

Quand elle est exprimée seule dans les cellules, la protéine W inhibe la voie NF-κB via son CTD spécifique (**Figure 1**). Ce résultat est en conformité avec le fait que l'inhibition de NF-κB par W est indépendante de sa capacité à interagir avec les protéines STAT (via son NTD commun avec P et V) et donc à inhiber la voie de signalisation des interférons de type 1 (**Figure 3A**). En contexte d'infection, W semble nécessaire à l'inhibition de la voie NF-κB activée par TNFα via son CTD spécifique (**Figure 6D**). Les effets fonctionnels sur la voie activée par TNFα présentés en contexte de transfection et en contexte d'infection sont donc cohérents. Cependant, le fait qu'un niveau d'activation de NF-κB comparable à celui des cellules non infectées ne soit pas restauré dans les cellules infectées avec le NiV déficient pour le CTD spécifique de W (même si la différence est non significative), pourrait suggérer que d'autres mécanismes viraux sont impliqués dans l'inhibition de NF-κB. Une protéine tronquée correspondant au NTD commun de P, V et W produite par rNiV W(CTD)ko a été mise en évidence lors de l'infection avec ce virus (**Figure 6B**, **astérisque**). Cette protéine n'est pas produite naturellement lors de l'infection par NiV et on peut s'interroger sur son impact sur les résultats précédemment rapportés dans les études utilisant des virus recombinants similaires. Ce point n'a jamais été discuté dans des études antérieures portant sur de tels virus recombinants (Yoneda et al. 2010 ; Lo et al. 2012 ; Satterfield et al. 2015).

W inhibe la voie NF-κB activée par IL-1β, TNFα, TRAF6 et IKKβ, suggérant un effet de W au niveau et/ou en aval du complexe IKK. Ces résultats coïncident avec la localisation majoritairement nucléaire de W lui permettant de facto un effet en aval de la voie. Plusieurs études suggèrent que certains effets de la protéine W, notamment l'inhibition de la production de cytokines, seraient dépendants de sa localisation nucléaire (Shaw et al. 2005 ; Lo et al. 2010). La localisation cellulaire de W est régie par plusieurs signaux d'import et d'export nucléaires. Nos résultats supportent d'ailleurs l'hypothèse d'un deuxième NLS présent dans W comme déjà suggéré par Audsley et al. en 2016 (**Figure 2** condition **WmNESmNLS**). Les détails de ces mécanismes de localisations font l'objet d'une partie spécifique « III. DETAILS DU MECANISME D'IMPORT ET D'EXPORT DE LA PROTEINE W ». L'inhibition de NF-κB par W mise en évidence ici est également dépendante de la localisation

nucléaire de W, mais indépendante des séquences d'acides aminés mutés de ses sites d'import et d'export (**Figure 3**).

Cette nécessité de la localisation nucléaire de W pour son effet sur NF-κB coïncide avec la localisation cellulaire de 14-3-3. En effet, W nucléaire permet la concentration des protéines 14-3-3 dans le noyau. De façon intéressante, quand W est exclue du noyau, les protéines 14-3-3, normalement diffuses dans la cellule, sont également exclues du noyau (**Figure 4A** condition **WmNLS**). Ces résultats, avec ceux obtenus par co-immunoprécipitation, suggèrent que W interagit avec les protéines 14-3-3 et favorise leur translocation nucléaire. Cependant la localisation de 14-3-3 dans le noyau n'est pas identique à celle de W (**Figure 2** conditions **W** et **WmNES**), suggérant que les protéines 14-3-3 une fois transloquées dans le noyau pourraient se dissocier de W pour interagir avec d'autres partenaires cellulaires. Cette hypothèse est également supportée par la perturbation de la co-immunoprécipitation de W et 14-3-3 quand p65 est surexprimée (l'interaction de p65 avec les protéines 14-3-3 ayant été précédemment décrite (Aguilera et al. 2016)). Dans ce cas, le rôle de W serait d'emmener et libérer 14-3-3 dans le noyau via une circulation continuelle entre le cytoplasme et le noyau. La corrélation observée entre la localisation nucléaire de W et son effet sur la voie NF-κB suggère que le mécanisme d'inhibition de W a une composante/étape nucléaire obligatoire. Etant donné la variabilité observée dans la localisation nucléaire de W selon le type cellulaire (Lo et al. 2010), qui pourrait dépendre du niveau d'expression des différents partenaires d'import et d'export de W, on peut s'interroger sur un effet inhibiteur de NF-κB par W, variable selon la cellule cible infectée. L'évaluation des différentes localisations cellulaires de W dans les différents types cellulaires est la prochaine étape pour mieux évaluer l'importance des effets de W en contexte d'infection.

Les protéines 14-3-3 sont impliquées dans la régulation de plusieurs voies de signalisation, par exemple dans la régulation des voies des TLR (Schuster et al. 2011 ; Ben-Addi et al. 2014). Il existe sept isoformes de 14-3-3 : α/β, γ, δ/ ζ, ε, η, θ et σ (β et ζ étant les formes phosphorylées de α et δ respectivement). Ces protéines régulent également la voie NF-κB. D'après, Aguilera et al. en 2016, les protéines 14-3-3 interagissent avec IκBα et p65. Les protéines 14-3-3 interagissent également avec le complexe A20 inhibiteur de NF-κB (Heyninck et al. 2004), sans impact fonctionnel clairement défini. Du fait des différents rôles des protéines 14-3-3 à de multiples étapes des voies de signalisation, il est difficile dans l'état actuel des connaissances de proposer un mécanisme d'action détaillé dans nos conditions d'expérimentation et de faire le lien entre l'effet inhibiteur de W sur la voie NF-κB et son effet sur les protéines 14-3-3. Cependant, en entraînant l'entrée des protéines 14-3-3 dans le noyau, W pourrait exacerber ou inhiber le rôle de ces protéines sur la voie NF-κB (ces deux scénarii sont détaillés dans la **Figure 7**). Afin de déterminer quelle implication l'effet de W sur les protéines 14-3-3 a sur la voie de NF-κB, plusieurs expérimentations sont en cours :

- immunoprécipitation de 14-3-3 pour détecter ou non la W en contexte de transfection et d'infection afin de confirmer l'interaction entre W et les protéines 14-3-3.

- comparer la localisation cellulaire des protéines 14-3-3 dans les cellules infectées avec les virus recombinants rNiV et rNiV W(CTD)ko.
- réaliser des expériences de compétition en co-immunoprécipitation de 14-3-3 avec p65 et IκBα en présence de W afin de confirmer ou infirmer l'utilisation d'un même site de liaison sur 14-3-3.
- éprouver la nécessité des protéines 14-3-3 dans l'effet inhibiteur de W sur la voie NF-κB.

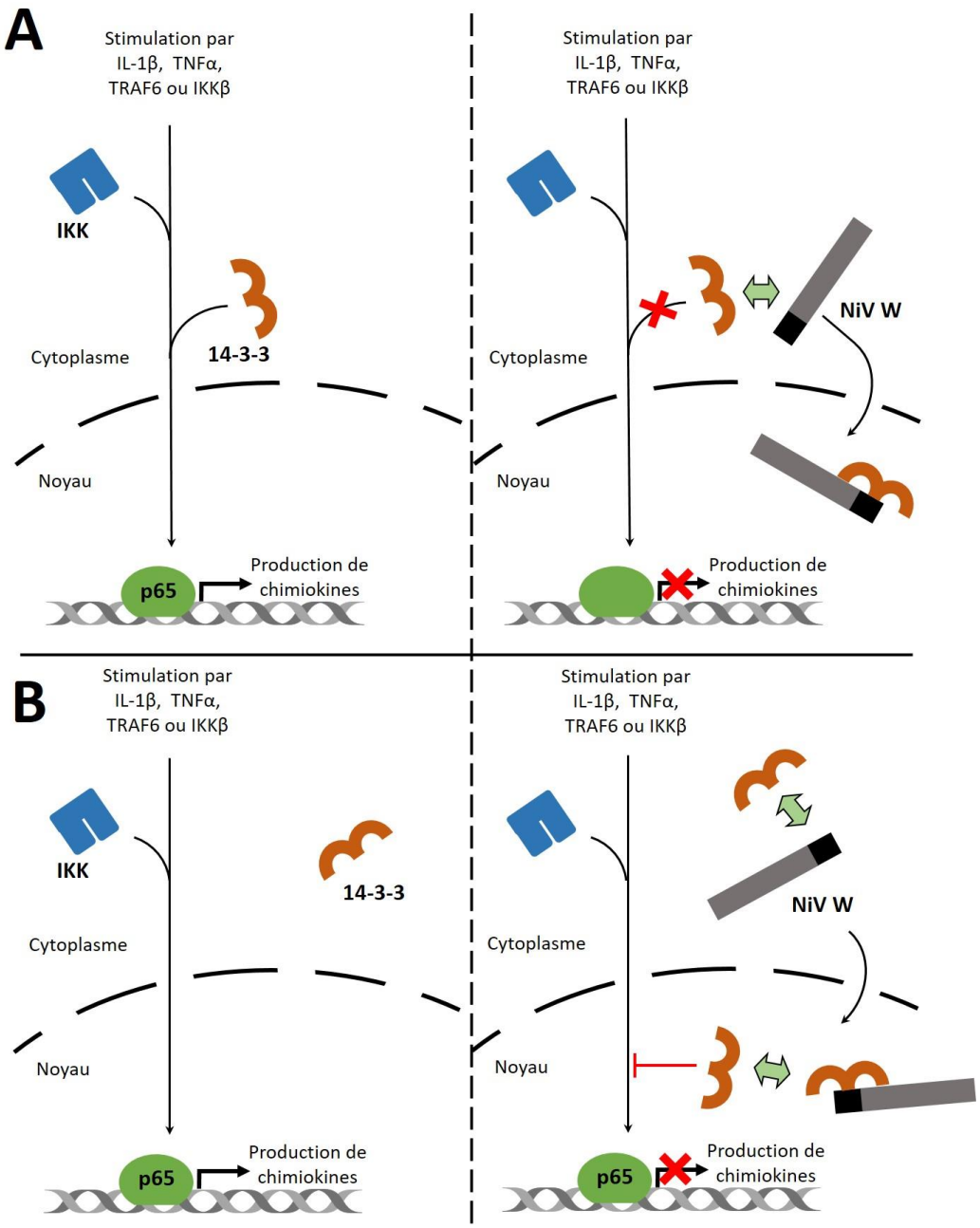


Figure 7 : *Modèle de travail pour l'étude de la nécessité de 14-3-3 dans l'effet inhibiteur de W sur la voie NF-κB. Scénario* ***A :*** *14-3-3 est impliqué dans l'activation de la voie NF-κB en aval de l'IKK complexe. L'expression de W dans la cellule entraîne une séquestration de 14-3-3 dans le noyau l'empêchant de jouer son rôle sur la voie. Scénario* ***B :*** *14-3-3 inhibe la voie NF-κB quand il est présent dans le noyau. L'expression de W augmente la présence nucléaire de 14-3-3 et favorise ainsi son effet inhibiteur.*

II. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB par NiV V

A. Introduction

La protéine V est le déterminant majeur du pouvoir pathogène de NiV (Satterfield et al. 2015). *In vitro*, V inhibe les voies de production des interférons de type 1 (Childs et al. 2007), ainsi que la voie JAK/STAT (Shaw et al. 2004 ; Ciancanelli et al. 2009). Bien que moins important que l'inhibition des cytokines par W dans les mêmes conditions, V semble également inhiber certaines cytokines lors de l'infection (Lo et al. 2010 ; Satterfield et al. 2015). Mais à ce jour, aucun mécanisme n'explique l'effet de V sur la production de cytokines. A l'instar de W, nous avons émis l'hypothèse d'une possible modulation de la voie NF-κB par V.

La protéine V de MeV a un effet inhibiteur sur la voie NF-κB dans les cellules HEK293T en contexte de transfection (Schuhmann et al. 2011). MeV V interagirait avec p65 via son domaine C-terminal pour séquestrer le facteur de transcription dans le cytoplasme. Il est possible qu'un tel mécanisme soit conservé chez NiV V. Bien qu'aucune interaction de NiV V avec p65 n'ait été rapportée dans « ANNEXE 1 : EXPLORATION DES INTERACTIONS CELLULAIRES DES PROTEINES V ET W DE NIV », une éventuelle interaction de NiV V avec p65 sera plus spécifiquement recherchée.

Il a été précédemment suggéré que NiV V interagirait avec la protéine UBXN1 via la première cystéine de son CTD (M. Yoneda, données non publiées). UBXN1 est un inhibiteur de la voie de production de l'IFN de type 1 via MAVS (Wang et al. 2013) et de NF-κB (Wang et al. 2015). NiV V pourrait renforcer l'effet inhibiteur d'UBXN1 sur la voie NF-κB (par stabilisation d'UBXN1 par exemple). Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, l'interaction de V avec UBXN1 sera plus précisément détaillée et l'effet de cette interaction sera exploré.

Comme dans la partie « I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB par NiV W », un effet de NiV V sur la voie NF-κB a été recherché et mis en évidence. Une attention particulière a été portée aux hypothèses présentées ci-dessus afin d'expliquer le mécanisme de cet effet.

B. Matériel et méthodes

Les conditions de culture des cellules HeLa (la même méthode a été utilisée pour les cultures de cellules HEK293T) et les techniques de tests fonctionnels luciférase, de western-blot, de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence ont été détaillées dans le « Matériel et Méthodes » de la partie « I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W ».

Les anticorps de lapin anti-STAT1 (Santa Cruz sc346), HSP70 (Santa Cruz sc24), HSP90 (Santa Cruz sc7947), UBXN1 (Invitrogen PA5-31809), IκBα (Cell Signaling 9242), p65 (Santa

Cruz sc372) et l'anticorps de souris anti-GAPDH (Chemicon MAB374) ont été utilisés pour détecter les protéines endogènes.

1. Constructions de plasmides

Les constructions des plasmides ont été détaillées dans la partie « I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W ». Les troncatures 1 à 110, 100 à 210, 200 à 310, 300 à 407, 1 à 210, 200 à 407, 1 à 310 et 100 à 407 du NTD de V ont été obtenues selon la même méthode que le plasmide codant pour le NTD, et sont donc couplées à la mCherry à leur extrémité C-terminale. Les plasmides codant pour les protéines MDA5 (numéro d'accession NM_022168.3), MAVS (numéro d'accession NM_020746.4) et UBXN1 (n° d'accession NM_001286077.1), étiquetées HA, ont été obtenus selon la même méthode que les plasmides codant pour TRAF6, IKKβ et p65. Les plasmides codant pour la protéine V (n° d'accession AF266287.1) de la souche Moraten du virus de la rougeole étiquetée Flag (Flag-MV Vmor) et pour les protéines mutées NiV V (C415A) et (C415I) ont été obtenus selon la même méthode que les plasmides codant pour les protéines non structurales de NiV.

2. Test de stabilité

$2{,}5\times10^5$ cellules HeLa par puits ont été ensemencées dans des plaques 12 puits. 20h après ensemencement, les cellules ont été transfectées avec un total de 1 µg des différents plasmides (250 ng de plasmide codant pour UBXN1 et 750 ng de plasmide codant pour NIV V ou 750 ng de vecteur vide) à l'aide de JetPrime (Polyplus), selon les recommandations du fabriquant. 5h après transfection, le milieu a été changé et les cellules ont été placées à l'étuve (à 37°C, 5% de CO_2) pour 15h supplémentaires. 20h après transfection, le milieu a été retiré et les cellules ont été traitées avec 1 ml de DMEM 10% à 20 µg/ml de cycloheximide (Sigma-Aldrich C104450). Les cellules ont ensuite été lysées dans 100 µl de tampon de lyse (50 mM Tris HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40, 50 mM NaF, 2 mM Na3VO4, 5% glycerol, 1X Complete protease inhibitor (Roche)) à différents temps après traitement (T+0h, T+2h, T+4h, T+6h, T+8h), incubées 20 minutes sur glace et centrifugées pendant 15 min à +4°C à 15000g. Pour chaque condition, 100 µl de surnageant ont été récupérés et 20 µl de tampon de charge (0.35 M Tris HCl [pH 6.8], 10.3% SDS, 36% glycerol, 0.6 M DTT, 0.012% bromophenol blue) ont été ajoutés. Ces échantillons ont ensuite été chauffés pendant 3 min à 100°C et analysés par western-blot comme détaillé dans la partie « I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W ». L'intensité du marquage d'UBXN1 pour chaque condition a été estimée en utilisant le logiciel ImageJ. Chaque condition a été réalisée en triplicat.

3. Analyse des résultats

Les histogrammes des tests fonctionnels représentent les moyennes de chaque condition + SD.

Les expérimentations des **Figures 4A**, **B**, **C**, **D** et **F** n'ont été réalisées qu'une seule fois. De ce fait, aucun test statistique n'a été effectué et ces données constituent des résultats préliminaires.

Pour les **Figures 1** et **4E**, les distributions normales de l'ensemble des valeurs des triplicats des différentes répétitions pour chaque condition ont été testées à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk. Les valeurs des différentes plaques ont été normalisées entre elles et les triplicats de chaque condition d'une même plaque ont été moyennés. Les différentes conditions ont été comparées au contrôle positif à l'aide du test de Student si la normalité était assumée (avec correction en cas de non homoscedasticité) ou sinon à l'aide du test de rang de Mann-Whitney.

Pour les analyses statistiques des tests fonctionnels, l'unité expérimentale est le puits et le seuil de significativité a été placé à 5%. « * » représente une $p < 0,05$, « ** » représente une $p < 0,01$, « *** » représente une $p < 0,001$ et « **** » représente une $p < 0,0001$.

C. RESULTATS

1. La protéine V inhibe la voie NF-κB via son CTD spécifique

Le plasmide codant pour la protéine V a été transfecté avec un gène rapporteur NF-κB_luc afin d'évaluer l'activation de la voie NF-κB dans des cellules HeLa. Dans les cellules non stimulées, V n'a pas d'effet sur le niveau basal d'activation de la voie NF-κB (**Figures 1A**), mais V présente un effet inhibiteur de la voie quand les cellules sont stimulées avec de l'IL-1β ou du TNFα ($p = 0,0033$ et $p = 0,0066$ respectivement).

Les troncatures étiquetées Flag correspondant au NTD de V (1-407) commun à P et V, et à son CTD spécifique (408-456) ont été fusionnées à la mCherry. Pour évaluer les effets de ces troncatures, la mCherry seule a été utilisée comme contrôle. Quand la voie NF-κB est activée avec de l'IL-1β, le NTD de V n'a pas d'effet inhibiteur (**Figures 1A**). A l'inverse, dans les mêmes conditions de stimulation, le CTD de V inhibe la voie NF-κB ($p = 0,0147$).

Afin de déterminer l'étape de la voie de NF-κB affectée par V, les cellules ont été stimulées par transfection de différents plasmides codant pour des effecteurs de la voie canonique : TRAF6, IKKβ et p65. De plus, compte-tenu de l'effet inhibiteur de V sur MDA5 (Childs et al. 2007), les plasmides codant MDA5 et MAVS ont également été utilisés pour activer la voie. Les stimulations avec IL-1β et TNFα ont également été réalisées comme contrôles. La protéine V inhibe fortement la voie activée par MDA5 ($p < 0,0001$), mais n'inhibe pas la voie activée par MAVS (**Figure 1B**). Ces résultats sont en conformité avec ceux de Childs et al. démontrant que NiV V interagit avec MDA5, inhibant sa capacité à activer les promoteurs des IFN de type 1 où NF-κB est l'un des trois transactivateurs de l'enhanceosome de l'IFN (Louber et al. 2015 ; Panne et al. 2007). En outre, V suractive la voie de NF-κB activée par TRAF6 et IKKβ et n'a pas d'effet sur la voie activée par p65 (**Figure 1B**). L'ensemble de ces

résultats suggèrent que V inhiberait une étape en amont de la voie NF-κB entre les récepteurs à l'IL-1R et TNFR et TRAF6, mais n'aurait pas d'effet inhibiteur (voire un effet activateur) en aval de TRAF6.

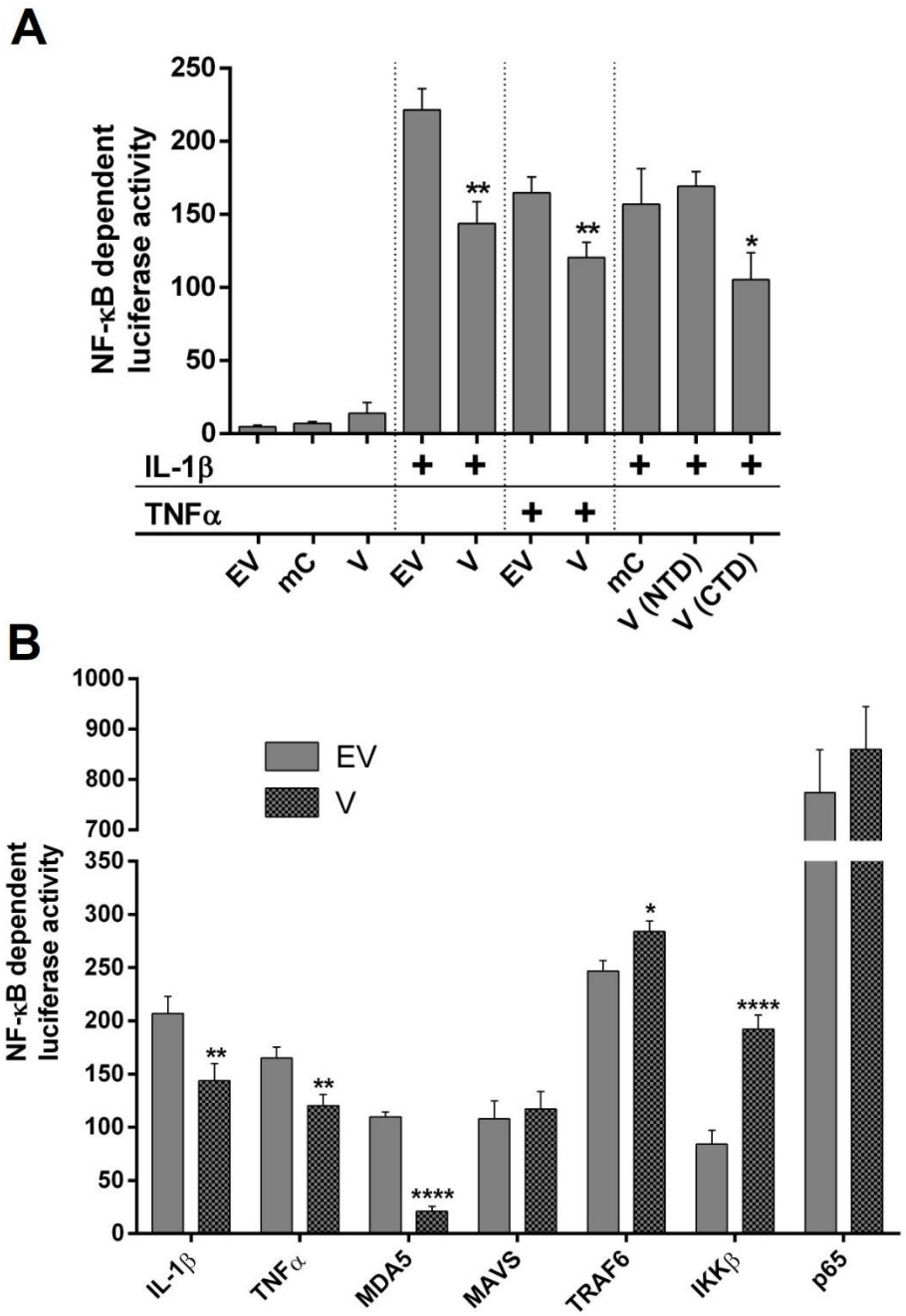


Figure 1 : *Détails sur l'effet de V sur la voie NF-κB.* ***A :*** *Des cellules HeLa ont été transfectées avec un gène rapporteur NF-κB_luc Firefly et un plasmide luciférase Renilla pRL-Null (pour la normalisation). Les cellules ont également été transfectées soit avec un vecteur vide (EV, utilisé comme contrôle) soit avec des plasmides codant pour les protéines V ou ses troncatures couplées à la mCherry (mC) ou la mCherry seule (utilisée comme contrôle des troncatures). 20h après transfection, les cellules ont été traitées avec de l'IL-1ß ou TNFα, à 10 ng/ml pendant 4h, puis la luminescence a été évaluée. Pour chaque stimulation, la condition, où les protéines virales ont été exprimées (V ou troncatures), a été comparée au contrôle (EV ou mC) correspondant.* ***B :*** *Mêmes conditions que A, mais pour la stimulation, les cellules ont été transfectées avec des plasmides codant pour les protéines MDA5, MAVS, TRAF6, IKKß ou p65, ou traitées 20h après transfection avec de l'IL-1ß ou TNFα (à 10 ng/µl) pendant 4h. La luminescence a ensuite été évaluée. Pour chaque stimulation, la condition, où la protéine V a été exprimée, a été comparée au contrôle (EV) correspondant.*

2. NiV V co-immunoprécipite avec STAT1, HSP70 et HSP90, mais ni avec p65 ni avec UBXN1 endogènes

Un plasmide codant pour la protéine non structurale V de NiV étiquetée Flag a été transfecté dans des cellules HeLa. Lors de co-immunoprécipitations révélées par western-blot utilisant des anticorps spécifiques, les protéines STAT1, HSP70 et HSP90 co-immunoprécipitent avec NiV V (**Figure 2A**). A contrario, aucune interaction n'a été détectée avec les protéines UBXN1, p65, IκBα et GAPDH, bien que celles-ci soient exprimées dans les cellules HeLa (**Figure 2A**).

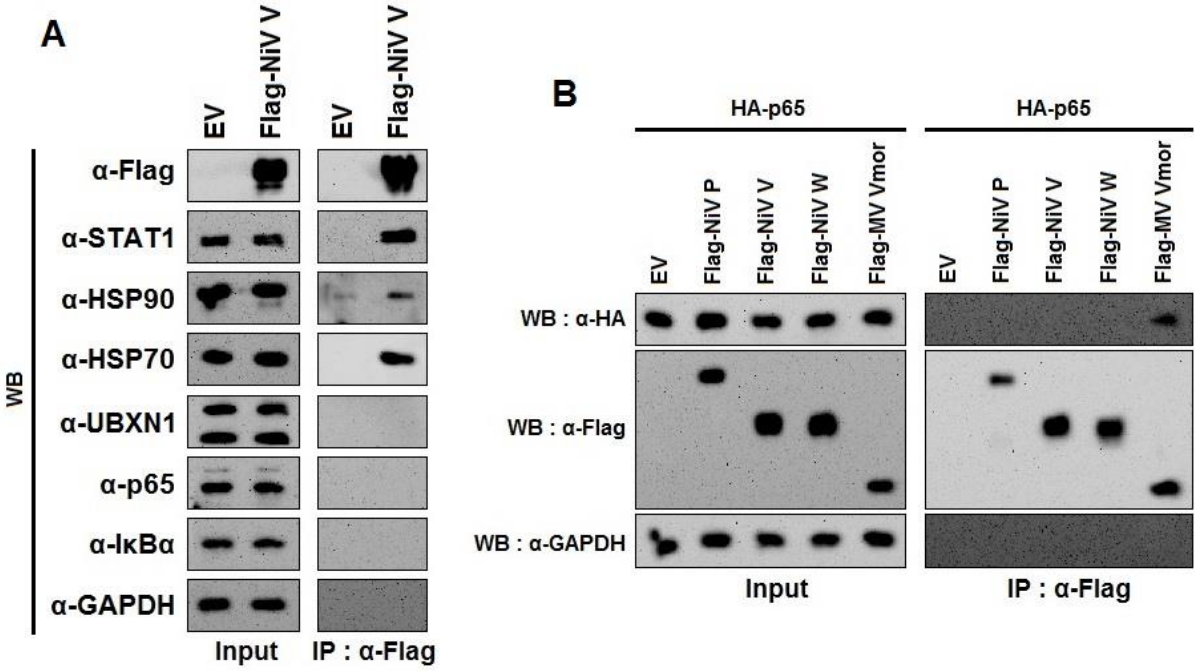


Figure 2 : *Exploration des interactions cellulaires des protéines P, V et W de NIV et V de MeV par co-immunoprécipitation.* ***A :*** *un plasmide codant pour la protéine V de NIV étiquetée Flag a été transfecté dans des cellules HeLa. Un vecteur vide (EV) a été utilisé comme contrôle. Après co-immunoprécipitation grâce à des billes magnétiques couplées avec des anticorps anti-Flag, la protéine V a été détectée par western-blot avec un anticorps anti-Flag et les protéines endogènes avec des anticorps spécifiques. La colonne de gauche montre les protéines présentes dans le lysat cellulaire. La colonne de droite montre les protéines présentes après co-immunoprécipitation.* ***B :*** *les plasmides codant pour les protéines P, V et W de NIV et la protéine V de MeV étiquetées Flag ont été transfectés avec un plasmide codant pour la protéine p65 étiquetée HA dans des cellules HeLa. Un vecteur vide (EV) a été utilisé comme contrôle. Après co-immunoprécipitation grâce à des billes magnétiques couplées avec des anticorps anti-Flag, les protéines P, V et W de NIV et V de MeV ont été détectées par western-blot avec un anticorps anti-Flag et la protéine p65 étiquetée HA avec un anticorps anti-HA. La colonne de gauche montre les protéines présentes dans le lysat cellulaire. La colonne de droite montre les protéines présentes après co-immunoprécipitation.*

L'interaction entre la protéine V de MeV et p65 ayant été détectée en contexte de co-transfection dans des cellules HEK293T (Schuhmann et al. 2011), des plasmides codant pour les protéines P, V et W de NiV et la protéine V de MeV étiquetées Flag ont été transfectés avec un plasmide codant pour la protéine p65 étiquetée HA dans des cellules HeLa. Lors de co-immunoprécipitations révélées par western-blot utilisant un anticorps anti-HA, la protéine p65 co-immunoprécipite bien avec V de MeV (**Figure 2B**) en contexte de co-transfection, mais n'interagit avec aucune des protéines P, V ou W de NiV (**Figure 2B**).

3. NiV V co-immunoprécipite avec UBXN1 en contexte de co-transfection

La protéine V de NiV interagirait avec UBXN1 via son domaine C-terminal et la première cystéine de son domaine C-terminal (C415) serait nécessaire à cette interaction (M. Yoneda, données non publiées). Cette cystéine n'est pas impliquée dans le motif en doigt de zinc (**Figure 3A**). En outre, elle est conservée dans le CTD de la V de NiV et de HeV, mais pas dans le CTD de la V de MeV (**Figure 3A**).

Des plasmides codant pour les protéines étiquetées Flag P, V, mCherry et les domaines N-terminal (commun avec P) et C-terminal de V (couplés à la mCherry) ont été transfectés avec un plasmide codant pour la protéine UBXN1 étiquetée HA dans des cellules HeLa. Lors de co-immunoprécipitations révélées par western-blot utilisant un anticorps anti-HA, la protéine UBXN1 co-immunoprécipite avec V via son domaine C-terminal en contexte de co-transfection, mais pas avec la protéine P ou le domaine N-terminal commun à P et V (**Figure 3B**). Par contre, les variants C415A et C415I sont aussi bien immunoprécipités que la construction sauvage dans les cellules HeLa. Donc, en contexte de co-transfection, la protéine UBXN1 co-immunoprécipite avec les deux protéines mutées NiV V C415A et C415I suggérant que la C415 ne participe pas à cette interaction (**Figure 3C**).

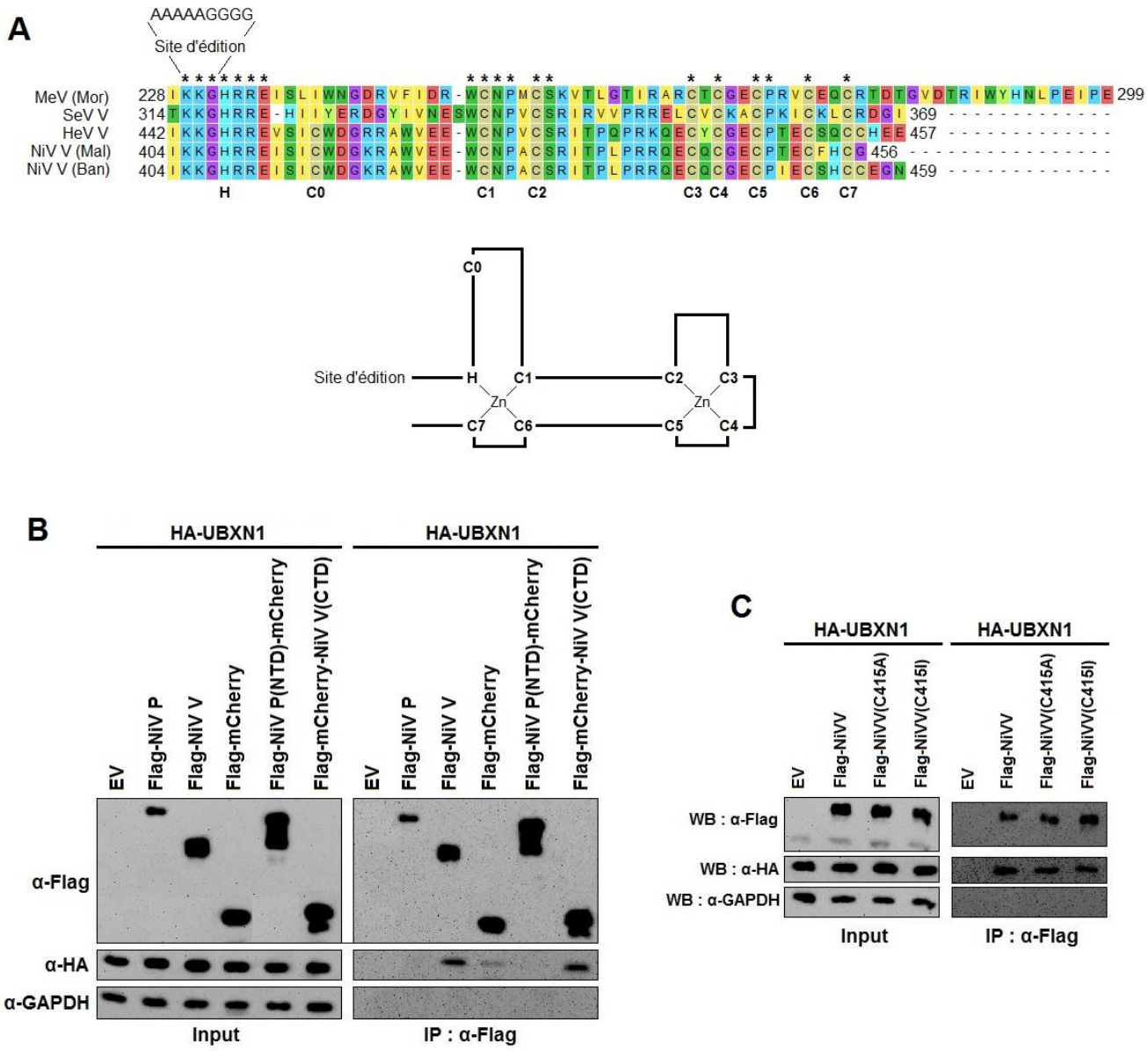


Figure 3 : *Interaction de la protéine V de NIV avec UBXN1.* ***A :*** *alignements des séquences d'acides aminés (à partir du site d'édition) des domaines C-terminaux des protéines V de MV, SeV, HeV et NiV (souche Malaisie (Mal) et Bangladesh (Ban)). Les « * » au-dessus de l'alignement représentent les homologies entre les cinq séquences. Les résidus cystéines et histidine sont numérotés et indiqués dans une réprésentation schématique du motif en doigt de zinc : les cystéines impliquées dans le motif sont numérotées de 1 à 7, la cystéine conservée entre HeV et NiV non impliquée dans le motif est numérotée C0.* ***B :*** *les plasmides codant pour les protéines P, V, mCherry et les NTD et CTD de V étiquetés Flag ont été transfectés avec un plasmide codant pour la protéine UBXN1 étiquetée HA dans des cellules HeLa. Un vecteur vide (EV) a été utilisé comme contrôle. Après co-immunoprécipitation grâce à des billes magnétiques couplées avec des anticorps anti-Flag, les protéines virales ont été détectées par western-blot avec un anticorps anti-Flag et la protéine UBXN1 étiquetée HA avec un anticorps anti-HA. La colonne de gauche montre les protéines présentes dans le lysat cellulaire. La colonne de droite montre les protéines présentes après co-immunoprécipitation.* ***C :*** *les plasmides codant pour les protéines V mutées (C415A) et (C415I) étiquetées Flag ont été transfectés avec un plasmide codant pour la protéine UBXN1 étiquetée HA dans des cellules HeLa. Un vecteur vide (EV) a été utilisé comme contrôle. Après co-immunoprécipitation grâce à des billes magnétiques couplées avec des anticorps anti-Flag, les protéines virales ont été détectées par western-blot avec un anticorps anti-Flag et la protéine UBXN1 étiquetée HA avec un anticorps anti-HA. La colonne de gauche montre les protéines présentes dans le lysat cellulaire. La colonne de droite montre les protéines présentes après co-immunoprécipitation.*

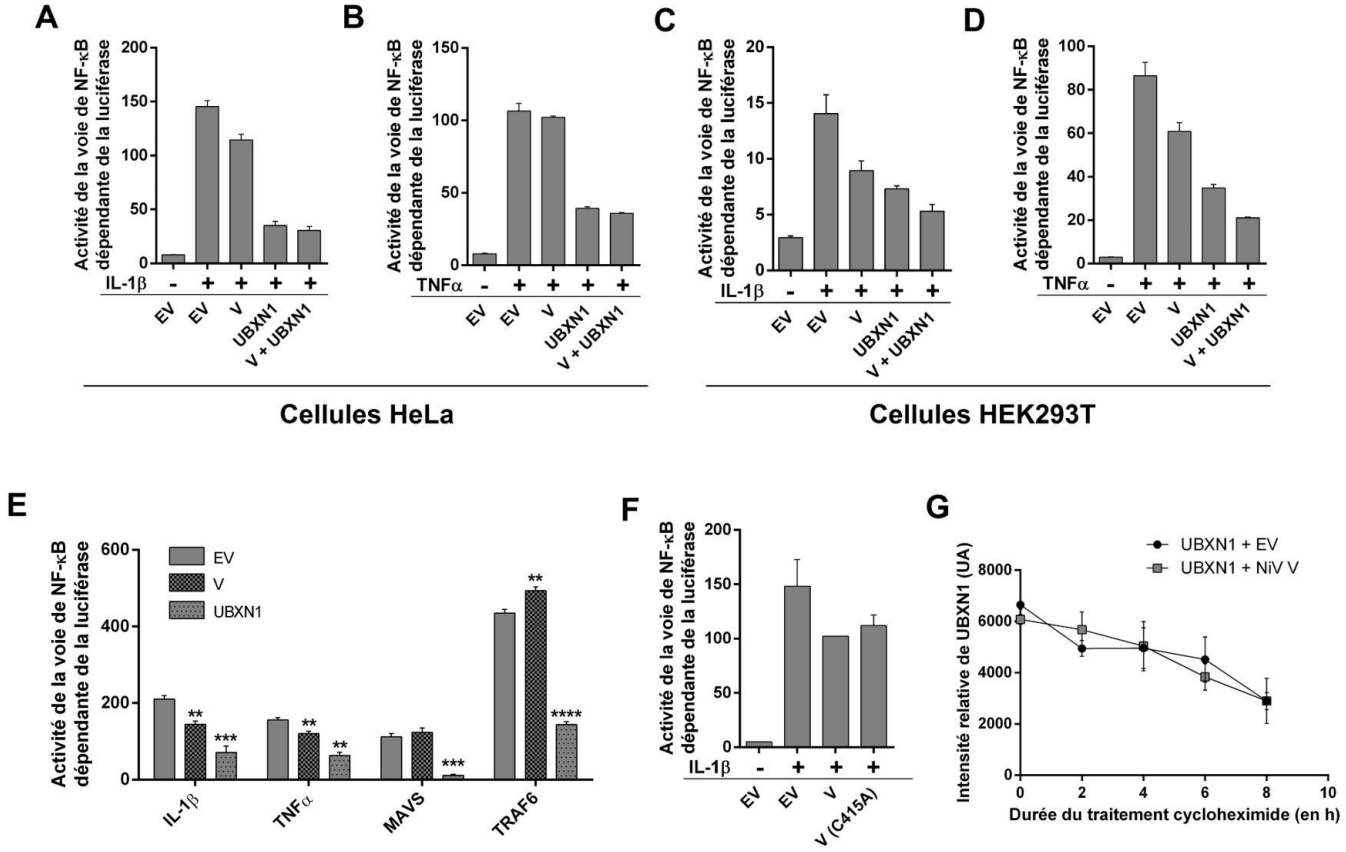


Figure 4 : *Effet des protéines V et UBXN1 transfectées sur la voie canonique NF-κB en cellules HeLa et HEK293T.* ***A et B :*** *les cellules HeLa ont été transfectées avec un gène rapporteur NF-κB_luc Firefly et un plasmide luciférase Renilla pRL-Null (pour la normalisation). Les cellules ont également été transfectées soit avec un vecteur vide (EV, utilisé comme contrôle) soit avec des plasmides codant pour les protéines V et/ou UBXN1. 20h après transfection, les cellules ont été traitées soit avec de l'IL-1ß (A) ou TNFα (B) à 10 ng/ml pendant 4h, puis la luminescence a été évaluée.* ***C et D :*** *Mêmes conditions que pour A et B mais en cellules HEK293T traitées avec de l'IL-1ß (C) ou TNFα (D).* ***E :*** *les cellules HeLa ont été transfectées avec un gène rapporteur NF-κB_luc Firefly et un plasmide luciférase Renilla pRL-Null (pour la normalisation). Les cellules ont également été transfectées soit avec un vecteur vide (EV, utilisé comme contrôle) soit avec des plasmides codant pour les protéines V ou UBXN1. Pour la stimulation, les cellules ont été transfectées avec des plasmides codant pour les protéines MAVS ou TRAF6 en plus des autres plasmides ou traitées 20h après transfection avec de l'IL-1ß ou TNFα (à 10 ng/µl) pendant 4h. La luminescence a ensuite été évaluée.* ***F :*** *les cellules HeLa ont été transfectées avec un gène rapporteur NF-κB_luc Firefly et un plasmide luciférase Renilla pRL-Null (pour la normalisation). Les cellules ont également été transfectées soit avec un vecteur vide (EV, utilisé comme contrôle) soit avec des plasmides codant pour les protéines V ou V (C415A). 20h après transfection, les cellules ont été traitées avec de l'IL-1ß à 10 ng/ml pendant 4h, puis la luminescence a été évaluée.* ***G :*** *les cellules HeLa ont été cotransfectées avec un plasmide codant pour la protéine UBXN1 et soit avec un vecteur vide (EV, utilisé comme contrôle) soit avec un plasmide codant pour la protéine V. 20h après transfection, les cellules ont été traitées à la cycloheximide (20 µg/ml) pendant différents temps 0, 2, 4, 6 ou 8h. Elles ont ensuite été lysées et la protéine UBXN1 a été détectée par WB. L'intensité du marquage de la protéine UBXN1 a été évaluée pour chaque condition en utilisant le logiciel ImageJ.*

Des tests fonctionnels utilisant un gène rapporteur NF-κB_luc ont été réalisés en cellules HeLa et HEK293T pour explorer les effets inhibiteurs des protéines UBXN1 et NiV V en contexte de transfection. Ces tests n'ayant été réalisés qu'une seule fois, les données, qui en sont issues, ne peuvent être considérées que comme des résultats préliminaires. En cellules HEK293T, la protéine V présenterait des effets inhibiteurs de la voie NF-κB activée par IL-1β (**Figure 4C**) et TNFα (**Figure 4C**) plus marqués que dans les cellules HeLa (**Figure 4A et 4B**). La protéine UBXN1 inhiberait la voie NF-κB activée par IL-1β et TNFα que ce soit en cellules HeLa ou en cellules HEK293T (**Figure 4A, 4B, 4C et 4D)**. Dans les cellules HeLa co-transfectées avec les plasmides codants pour NiV V et UBXN1, l'effet inhibiteur observé ne serait pas plus important que dans la condition transfectée avec UBXN1 seule (**Figure 4A et 4B**). A contrario, en cellules HEK293T co-transfectées avec les plasmides codants pour NiV V et UBXN1, l'effet inhibiteur observé serait plus important que dans la condition transfectée avec UBXN1 seule (**Figure 4C et 4D**), mais serait inférieur au cumul des effets observés avec chacune des protéines V et UBXN1 exprimées seules.

Des cellules HeLa ont été stimulées avec IL-1β, TNFα ou par transfection de différents plasmides codant pour les protéines MAVS et TRAF6. Ainsi stimulées, les cellules ont également été transfectées soit avec un plasmide codant pour NiV V soit pour UBXN1. Alors qu'UBXN1 a un effet inhibiteur statistiquement très significatif sur la voie NF-κB stimulée par IL-1β, TNFα, MAVS et TRAF6, la protéine V ne présente un effet inhibiteur que sur la voie stimulée par IL-1β et TNFα (**Figure 4E**). Des cellules HeLa stimulées avec IL-1β ont ensuite été transfectées avec un plasmide codant pour la protéine V ou la protéine V mutées C415A (résidus correspondant à la première cystéine du CTD). Dans ces conditions, les protéines V et V(C415A) présenteraient un niveau d'inhibition similaire de la voie NF-κB (**Figure 4F**, résultats préliminaires).

Afin de déterminer si la présence de V stabiliserait UBXN1, l'évolution de l'expression d'UBXN1 au cours du temps a été suivie dans des cellules où la traduction protéique a été inhibée en présence ou non de V. Pour ce faire, des cellules HeLa ont été co-transfectées avec des plasmides codant pour les protéines UBXN1 et NiV V ou un vecteur vide (utilisé comme contrôle), puis traitées avec de la cycloheximide. A différents temps de traitement, les cellules ont été lysées et la quantité de protéine UBXN1 a été déterminée par analyse du marquage en western-blot. Suite au traitement à la cycloheximide, les deux conditions (avec ou sans V) présentent une quantité d'UBXN1 à T0 et une diminution de cette quantité au cours du temps, qui sont comparables, suggérant que V ne stabilise pas UBXN1 (**Figure 4G**).

D. Conclusion de la partie II.

En condition de transfection en cellules HeLa, la protéine V de NiV inhibe la voie NF-κB activée par MDA5 (**Figure 1B**), comme attendu (Childs et al. 2007). NiV V présente également un effet inhibiteur de la voie NF-κB, quand elle est activée par IL-1β et TNFα (**Figure 1A**), mais montre à l'inverse un effet suractivateur quand la voie est activée par surexpression de TRAF6

ou IKKβ. Ces résultats suggèrent un effet inhibiteur en amont de la voie. Cet effet inhibiteur de V a également été mis en évidence en cellules HEK293T (**Figure 4C** et **4D**, résultats préliminaires). Dans l'état actuel des connaissances, aucune donnée n'explique l'effet inhibiteur de V sur la voie NF-κB activée par IL-1β et TNFα.

Plusieurs mécanismes d'inhibition des voies de signalisation de l'immunité innée sont communs aux protéines non structurales des paramyxovirus : effet sur les protéines STAT (Ramachandran et Horvath 2009), sur MDA5 (Childs et al. 2007), LGP2 (Parisien et al. 2009), etc… L'interaction de NiV V avec STAT1 est d'ailleurs observée dans nos conditions expérimentales (**Figure 2A**), validant ainsi notre système d'exploration d'interactions. En contexte de transfection, la protéine V de MeV a un effet inhibiteur sur la voie NF-κB dans les cellules HEK293T (Schuhmann et al. 2011). Cet effet a été expliqué par une interaction de V de MeV avec p65 via son CTD, obtenue en contexte de co-transfection. La V de MeV retiendrait p65 dans le cytoplasme l'empêchant ainsi de jouer son rôle de facteur de transcription. Cependant cette interaction n'a été mise en évidence ni dans des cellules HEK293T transfectées avec MeV V (non co-transfectées avec p65), ni dans des HEK293T infectées avec MeV (Komarova et al. 2011). Au niveau fonctionnel, alors que l'effet de MeV V a été observé sur la voie NF-κB activée par TNFα, MAVS, IKKs et p65 (Schuhmann et al. 2011), nos résultats suggèrent que l'effet de NiV V sur NF-κB ne se produit qu'en amont de TRAF6. En contexte de transfection, aucune interaction n'a été observée entre NiV V et p65 en cellules HeLa, alors que ces cellules expriment p65 (**Figure 2A**). De plus, en contexte de co-transfection avec p65, alors que l'interaction avec MeV V est observée, aucune interaction n'est détectée entre p65 et les protéines P, V et W de NiV (**Figure 2B**). L'ensemble de ces données suggèrent que le mécanisme par lequel la protéine V de NiV inhibe la voie NF-κB n'est pas semblable à celui décrit pour la protéine V de MeV.

La protéine V de NiV interagirait avec la protéine UBXN1 via son CTD spécifique (M. Yoneda, données non publiées). UBXN1 est un inhibiteur de la production d'IFN de type 1 et de la voie NF-κB par interaction avec MAVS (Wang et al. 2013). De plus, UBXN1 inhibe la voie NF-κB à d'autres niveaux en interagissant avec les protéines cIAP (Wang et al. 2015) et Cullin-1 (Hu et al. 2017). Le CTD des protéines V des paramyxovirus est très conservé avec un motif en doigt de zinc (Ramachandran et al. 2009). Les résidus cystéines et histidine du CTD de la protéine V des paramyxovirus sont impliqués dans ce motif en doigt de zinc et la suppression d'un de ces résidus déstabiliserait la structure du CTV de V. Cependant la première cystéine du CTD de NiV V n'est pas impliquée dans le motif en doigt de zinc (**Figure 3A**). D'une façon intéressante, alors que les résidus cystéine et histidine impliqués dans le motif en doigt de zinc sont conservés chez MeV, NiV et HeV, la première cystéine du CTD de NiV V n'est conservée que chez HeV et est située entre la première histidine et la première cystéine (la seconde du CTD) impliquées dans le motif en doigt de zinc. L'interaction entre NiV V et UBXN1 est une hypothèse intéressante pour expliquer l'effet inhibiteur de NiV V observé sur la voie NF-κB. Cependant, plusieurs de nos données ne sont pas cohérentes avec cette hypothèse. Au niveau fonctionnel, alors qu'UBXN1 inhibe la voie NF-κB quand elle est activée par IL-1β, TNFα, MAVS

et TRAF6, l'effet inhibiteur de V n'est observable que suite à une stimulation par IL-1β ou TNFα (**Figure 4E**). Si NiV V stabilise UBXN1 et renforce ainsi ses effets sur la voie NF-κB, on s'attendrait à observer un effet inhibiteur de V au niveau de chaque effet inhibiteur d'UBXN1. De plus, la co-transfection d'UBXN1 et de NiV V en cellules HeLa ne semble pas avoir d'effet synergique sur les effets d'UBXN1 (**Figure 4A, B, C** et **D**, résultats préliminaires) et ne permet pas d'augmenter la quantité d'UBXN1 dans les cellules ni de limiter sa dégradation suite à l'inhibition de la traduction des protéines (**Figure 4G**). La mutation de la première cystéine du CTD de NiV V en alanine ne semble pas diminuer l'effet inhibiteur observé (**Figure 4E**, résultats préliminaires). En cellules HeLa, NiV V via son CTD co-immunoprécipite avec UBXN1 apporté de manière exogène (co-transfection) (**Figure 3B**), mais non avec la protéine UBXN1 endogène (**Figure 2A**). La mutation de la première cystéine du CTD de NiV V en alanine ou en isoleucine ne permet pas d'abroger cette interaction (**Figure 3C**). Ainsi, malgré l'observation d'une co-immunoprécipitation entre NiV V et UBXN1 en contexte de co-transfection, l'hypothèse, que l'interaction de NiV V avec UBXN1 permettrait d'expliquer l'effet de V sur la voie NF-κB observé en cellules HeLa, ne peut être validée dans nos conditions expérimentales. La confirmation de ces données dans d'autres systèmes cellulaires nécessitera des expérimentations supplémentaires.

III. DETAILS DU MECANISME D'IMPORT ET D'EXPORT DE LA PROTEINE W

A. Introduction

La protéine W de NiV a initialement été décrite comme une protéine essentiellement nucléaire, du fait de la présence d'un NLS dans son CTD spécifique (Shaw et al. 2004). Cependant, sa localisation cellulaire semble régie par des mécanismes plus complexes, mettant en jeu différents sites d'import et d'export nucléaires (Rodriguez et al. 2004 ; Shaw et al. 2005 ; Audsley et al. 2016) : en plus du NLS de son CTD, W partage avec P et V un NES et un NLS situés dans leur NTD commun. Ces différents sites font intervenir différents partenaires, parmi lesquels les importines α1, 3 et 4 et l'exportine 1. Curieusement, W a été aussi décrite comme étant essentiellement cytoplasmique dans certains types cellulaires (Lo et al. 2010). En outre, la localisation nucléaire de W serait nécessaire à certains de ses effets fonctionnels (Shaw et al. 2005 ; Lo et al. 2010), comme c'est le cas pour l'effet inhibiteur sur la voie NF-κB identifié dans la partie « I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W ». Ainsi, les effets fonctionnels de W pourraient être dépendants du type cellulaire. Une meilleure compréhension des mécanismes régissant la localisation cellulaire de W est donc essentielle pour aborder les rôles de cette protéine au cours de l'infection virale des différents types cellulaires d'un hôte.

Les localisations du NES et du NLS du CTD ont été identifiées. Mais, bien que son existence ait été suggérée, le NLS du NTD n'a pas encore été localisé. Dans cette partie, les localisations cellulaires de différents mutants de W ont été déterminées par immunofluorescence, afin de localiser les différents sites d'import et d'export de W et d'évaluer leurs effets.

B. Matériel et méthodes

Les conditions de culture des cellules HeLa, ainsi que les techniques de construction de plasmides, de western-blot et d'immunofluorescence ont été détaillées dans le « Matériel et Méthodes » de la partie « I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W ».

Les prédictions pour la localisation du NLS localisé dans le NTD de W ont été obtenues en confrontant les résultats de deux outils de prédictions des NLS disponibles sur internet : « NLS Mapper » 2017 et « USC MLEG Group: Research » 2017. Les analyses ont été réalisées sur la séquence entière de W avec un seuil de « 0.1 » pour l'outil « USC MLEG Group » et avec un seuil de « 3.0 » et une recherche des NLS bipartites dans la séquence entière pour l'outil « NLS Mapper ».

C. Résultats

1. Localisation cellulaire des protéines P, V et W de NiV

Les protéines P, V et W de NiV partagent un NTD en commun (407 premiers acides aminés) et ont des CTD spécifiques. Elles partagent donc le NES situé dans le NTD (vers le résidu 180). Le NLS (ci-dessous appelé NLS spé) de W est situé dans son CTD spécifique et n'est donc présent ni dans la P ni dans la V (cf. **Figure 6** du « I. D. 3. Les protéines virales et leurs fonctions connues », dans la 1ère partie).

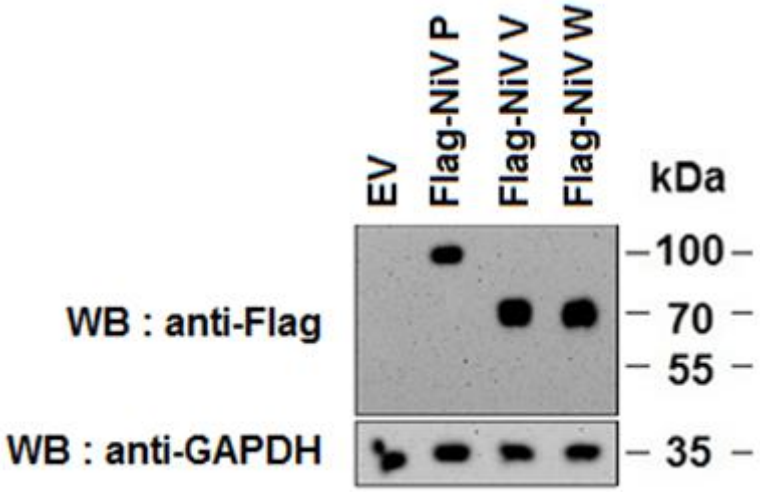


Figure 1 : *Analyse des profils d'expression des protéines P, V et W de NiV par western-blot. Des cellules HeLa ont été transfectées avec le plasmide approprié permettant l'expression de protéines étiquetées Flag ou avec un vecteur vide (EV). 20h après transfection, les cellules ont été lysées et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et marquées à l'aide d'un anticorps anti-Flag et un anticorps anti-GAPDH (contrôle du dépôt des échantillons). L'échelle de taille des protéines est indiquée à droite.*

Afin de déterminer si les protéines P, V et W peuvent diffuser passivement dans le noyau, leur tailles respectives ont été estimées par western-blot. La protéine P a une masse moléculaire d'environ 100 kDa, les protéines V et W ont une masse moléculaire d'environ 70 kDa (**Figure 1**) et donc supérieure à la limite permettant la diffusion passive des molécules à travers les pores nucléaires (Swanson et McNeil 1987).

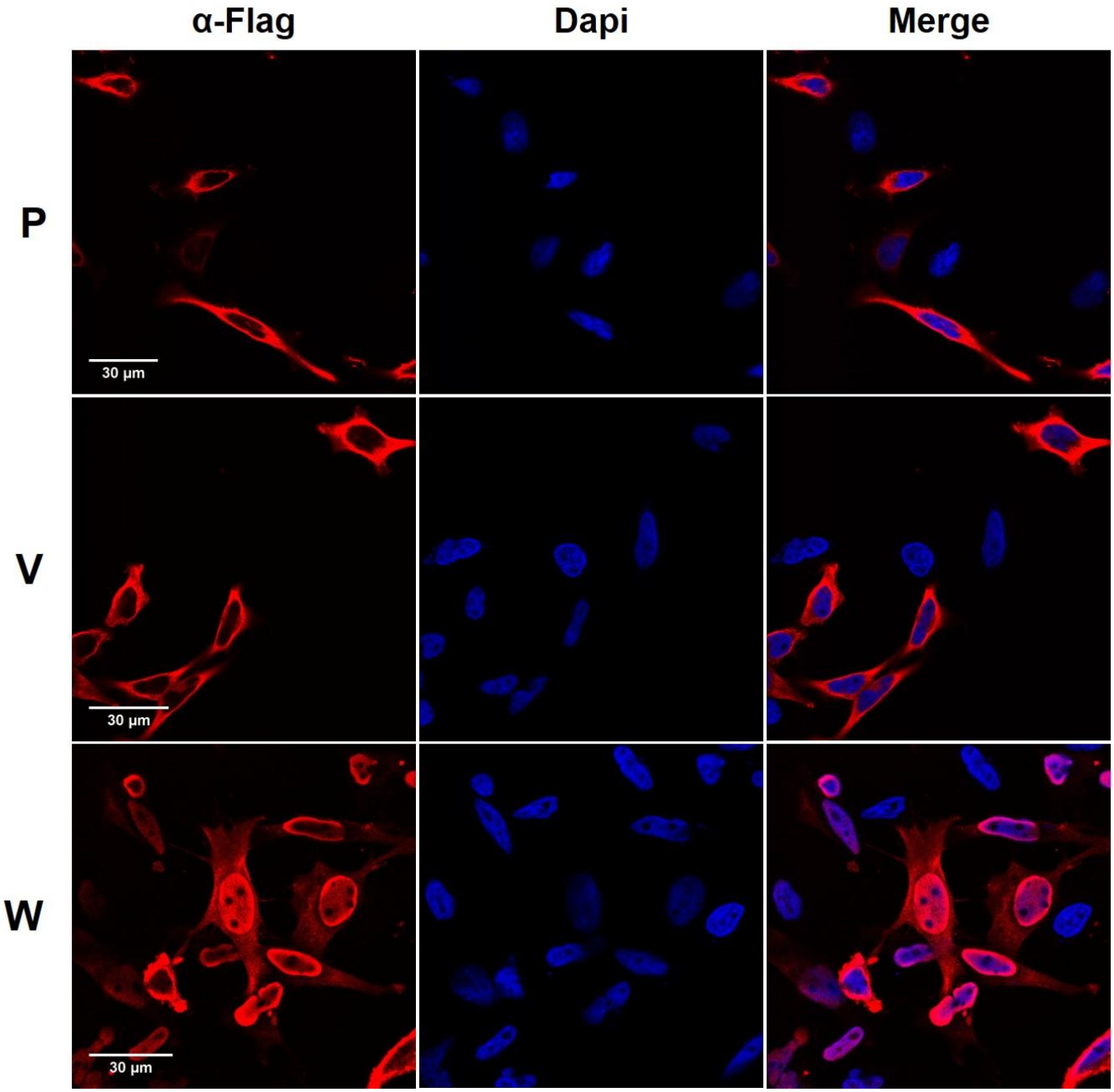


Figure 2 : *Mise en évidence de la localisation cellulaire des protéines P, V et W de NiV. Des cellules HeLa ont été transfectées avec différents plasmides permettant l'expression des protéines étiquetées Flag (indiquées à gauche). 20h après transfection, les cellules ont été fixées et perméabilisées. Les protéines ont été marquées à l'aide d'un anticorps de souris anti-Flag et un anticorps anti-souris conjugué avec le fluorochrome Alexa 555. Les noyaux ont été marqués à l'aide de Dapi. Les images présentées ont été réalisées avec l'objectif x63 et sont représentatives des photos obtenues pour chaque condition. La barre en bas à gauche indique l'échelle.*

Les protéines P et V sont quasi exclusivement localisées dans le cytoplasme (**Figure 2, conditions P et V**), alors que W se localise majoritairement dans le noyau (**Figure 2, condition W**). A noter qu'une proportion conséquente de W reste localisée dans le cytoplasme. De plus, lorsque le plan focal est placé sur le noyau (marcage Dapi net), la W semble majoritairement localisée en périphérie du noyau, et lorsque le plan focal est placé de façon à avoir le marquage le plus intense de W, il ne correspond pas au plan où le marquage du noyau est le plus intense.

2. La localisation nucléaire de W est régie par différents signaux d'import et d'export

La localisation de la protéine W, précédemment décrite, est présentée comme référence (**Figure 3, condition W**). Quand le NLS_spé de W est muté, la protéine est quasi exclusivement localisée dans le cytoplasme (**Figure 3, condition WmNLS**). La localisation ainsi obtenue est similaire à celles de la P et de la V. La mutation du NES du NTD commun à P, V et W permet une distribution quasi exclusivement nucléaire de la protéine (**Figure 3, condition WmNES**). Enfin, quand à la fois le NES du NTD et le NLS_spé sont mutés, la protéine se localise à la fois dans le noyau et le cytoplasme (**Figure 3, condition WmNESmNLS**).

3. Prédictions de la localisation des NLS de W

Les prédictions des outils disponibles sur internet ont été résumées dans le **Tableau 1**. Les deux outils de prédiction permettent d'identifier le NLS_spé déjà décrit dans le CTD de W. Ils permettent également d'identifier une région du NTD où pourrait se trouver le second NLS commun aux trois protéines P, V et W (nommé ci-après NLS_com) : le NLS_com serait monopartite de 323 à 332 pour « USC MLEG Group » et bipartite de 318 à 350 pour « NLS Mapper ». En outre, un troisième signal est identifié par les deux outils au début du CTD de W vers la position 408, mais « NLS Mapper » l'associe en NLS bipartite au NLS_spé déjà identifié du CTD.

Tableau 1 : *Résumé des prédictions de NLS obtenues avec les outils « USC MLEG Group » et « NLS Mapper » disponibles sur internet. Les résidus prédits par les deux outils ont été indiqués en gras.*

Outils	**NLS prédit**	
	Séquence	**Localisation**
USC MLEG Group	**KRLPMLAEEF**	323 -332
	AQT**RNIHLLGRK**	408 - 419
	PPTKKARVSMRR	436 - 447
NLS Mapper	**Monopartite**	
	DH**PPTKKARVS**	434 - 444
	Bipartite	
	EEPPQ**KRLPMLAEEF**ECSGSEDPIIRELLKENS	318 - 350
	RNIHLLGRKTCLGRRVVQPGMFEDH**PPTKKARVSM**	411 -445

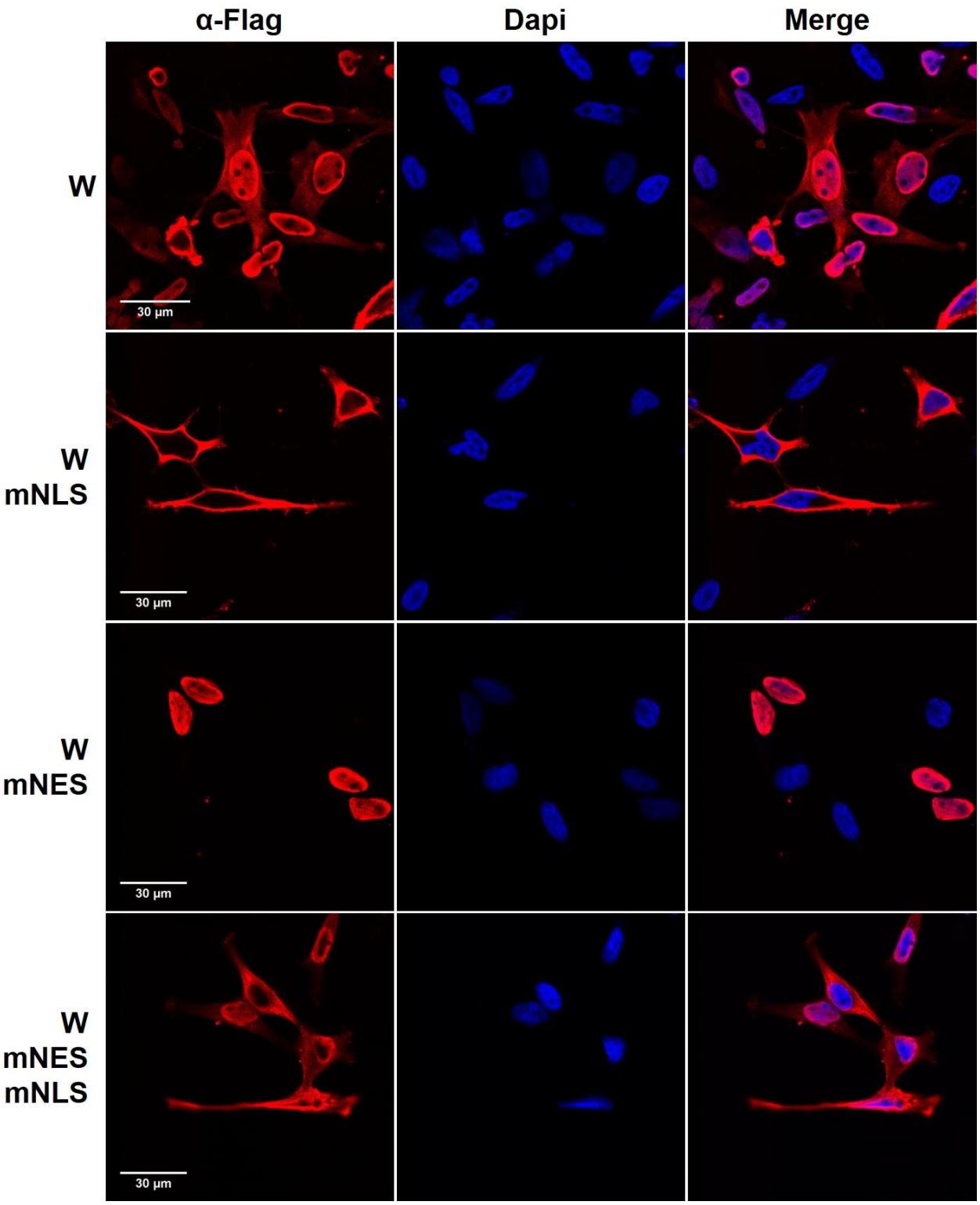


Figure 3 : *Mise en évidence de la localisation cellulaire des mutants W de NiV: W (utilisée comme référence), WmNLS décrit par Shaw et al. 2005, WmNES décrit par Rodriguez et al. 2004 et WmNESmNLS portant les deux ensembles de mutations. Des cellules HeLa ont été transfectées avec différents plasmides permettant l'expression des protéines étiquetées Flag (indiquées à gauche). 20h après transfection, les cellules ont été fixées et perméabilisées. Les protéines ont été marquées à l'aide d'un anticorps de souris anti-Flag et un anticorps anti-souris conjugué avec le fluorochrome Alexa 555. Les noyaux ont été marqués à l'aide de Dapi. Les images présentées ont été réalisées avec l'objectif x63 et sont représentatives des photos obtenues pour chaque condition. La barre en bas à gauche indique l'échelle.*

4. Les résidus K323, R324, R343 et K347 ne sont pas nécessaires à la localisation nucléaire de WmNESmNLS

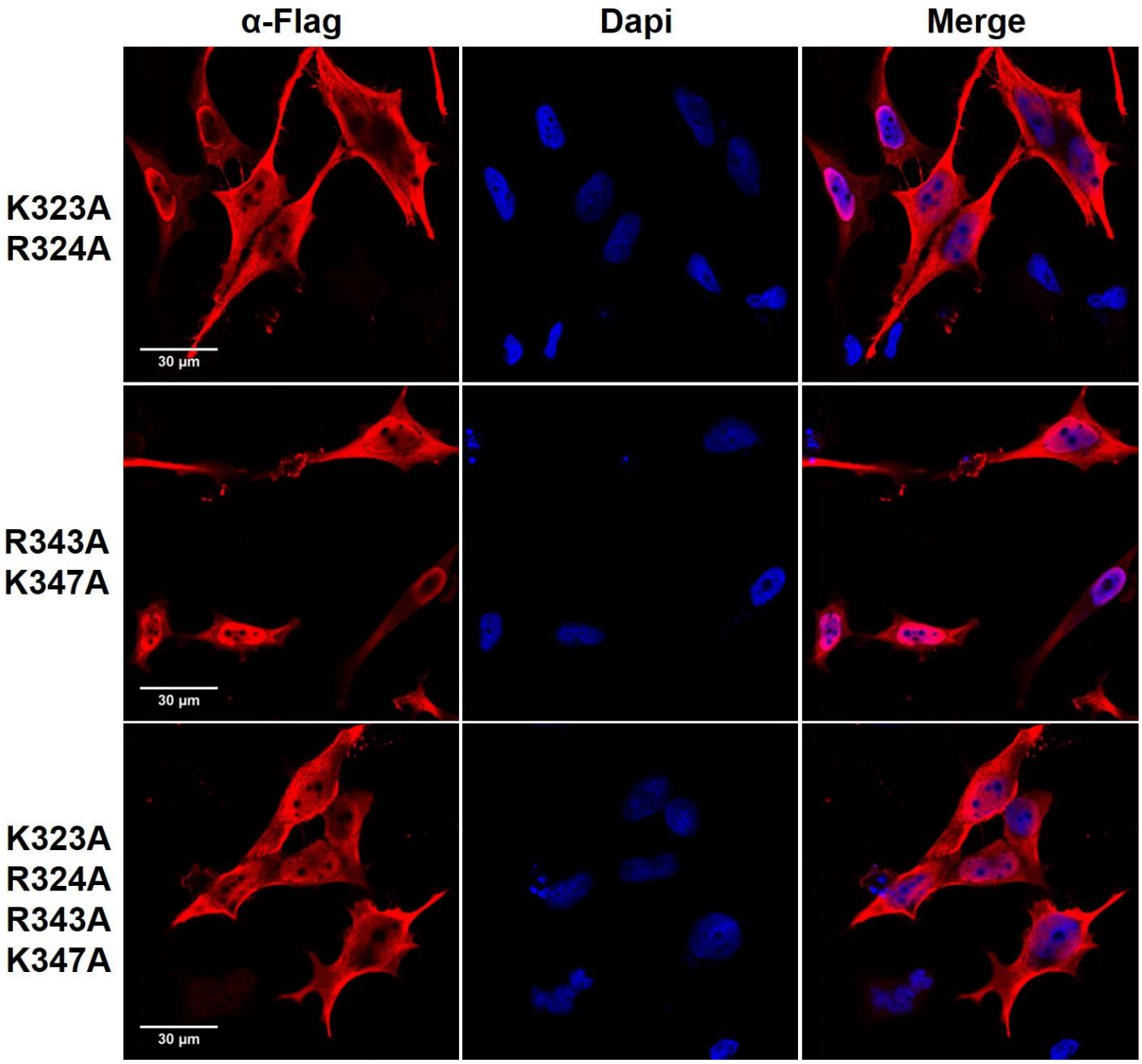


Figure 4 : *Mise en évidence de la localisation cellulaire de différents mutants WmNESmNLS de NiV par immunofluorescence. La protéineWmNESmNLS a été mutée pour les résidus K323A;R324A, R343A;K347A et K323A;R324A;R343A;K347A selon les résultats des outils de prédiction. Des cellules HeLa ont été transfectées avec différents plasmides permettant l'expression des protéines étiquetées Flag (indiquées à gauche). 20h après transfection, les cellules ont été fixées et perméabilisées. Les protéines ont été marquées à l'aide d'un anticorps de souris anti-Flag et un anticorps anti-souris conjugué avec le fluorochrome Alexa 555. Les noyaux ont été marqués à l'aide de Dapi. Les images présentées ont été réalisées avec l'objectif x63 et sont représentatives des photos obtenues pour chaque condition. La barre en bas à gauche indique l'échelle.*

La région du NTD prédite par les deux outils pour porter le NLS_com contient quatre résidus basiques : K323, R324, R343 et K347. Ils ont été mutés en alanine dans trois constructions différentes, afin de déterminer lesquels de ces résidus sont nécessaires à la localisation nucléaire de la protéine WmNESmNLS (mutées pour le NES du NTD et pour le NLS_spé du CTD et se localisant majoritairement dans le noyau). Les mutants K323A;R324A, R343A;K347A et K323A;R324A;R343A;K347A de la protéine WmNESmNLS se distribuent de façon uniforme dans le cytoplasme et le noyau (**Figure 4**).

5. Le NLS du NTD commun n'est pas fonctionnel en cellules HeLa

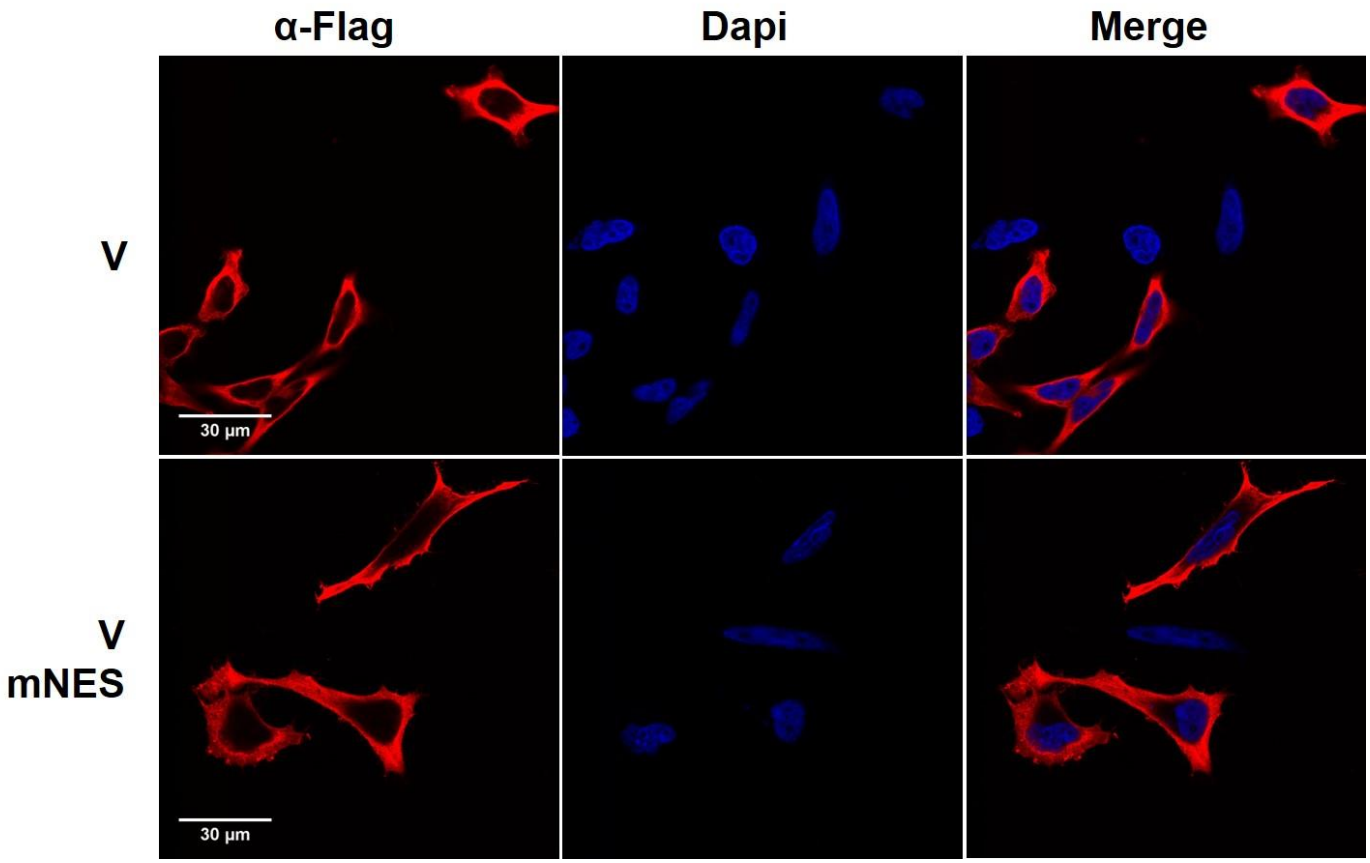


Figure 5 : *Mise en évidence de la localisation cellulaire du mutant VmNES de NiV par immunofluorescence : V (utilisée comme référence) et VmNES (L174A;L186A) décrit par Rodriguez et al. 2004. Des cellules HeLa ont été transfectées avec différents plasmides permettant l'expression des protéines étiquetées Flag (indiquées à gauche). 20h après transfection, les cellules ont été fixées et perméabilisées. Les protéines ont été marquées à l'aide d'un anticorps de souris anti-Flag et un anticorps anti-souris conjugué avec le fluorochrome Alexa 555. Les noyaux ont été marqués à l'aide de Dapi. Les images présentées ont été réalisées avec l'objectif x63 et sont représentatives des photos obtenues pour chaque condition. La barre en bas à gauche indique l'échelle.*

Afin de déterminer si le NLS_com permet la localisation nucléaire de V en cellules HeLa, comme cela a été décrit en cellules VERO (Audsley et al. 2016), la protéine V a été mutée pour son NES. La localisation de la protéine V, précédemment décrite, est présentée comme référence (**Figure 5, condition V**). Quand le NES du NTD spécifique de V est muté, la protéine

est quasi exclusivement localisée dans le cytoplasme et présente une localisation similaire à celle de V (**Figure 5, condition VmNES**).

D. Conclusion de la partie III.

Plusieurs sites d'import et d'export ont été identifiés dans la protéine W de NiV (**Figure 6**). Le NES interagissant avec l'exportine 1 a été localisé dans le NTD commun aux protéines P, V et W (Rodriguez et al. 2004) et le NLS_spé interagissant avec les importines α3 et α4 (et possiblement avec l'importine α1 dans une moindre mesure) a été localisé dans le CTD spécifique de W (Shaw et al. 2005 ; Audsley et al. 2016). Le deuxième NLS_com, se trouvant dans le NTD et interagissant avec l'importine α1, contribuerait également à la localisation nucléaire de W (Shaw et al. 2005 ; Audsley et al. 2016), mais n'a pas encore été localisé à ce jour. Ce deuxième NLS_com permettrait à la V d'être en partie localisée dans le noyau quand le NES n'est pas fonctionnel, mais ne le permettrait pas à la P (Audsley et al. 2016).

La protéine W a une masse moléculaire d'environ 70 kDa (**Figure 1**) et ne peut pas diffuser passivement dans le noyau (Swanson et McNeil 1987). Elle est néanmoins majoritairement localisée dans le noyau du fait du NLS_spé identifié dans son CTD spécifique (**Figure 2**), mais est également présente dans le cytoplasme, du fait du NES identifié dans son NTD. En effet, quand ce NES est muté, la protéine W se localise quasi exclusivement dans le noyau. A l'inverse, quand le NLS_spé est muté, la protéine W se localise quasi exclusivement dans le cytoplasme (**Figure 3**). Quant à la fois le NES et le NLS_spé sont mutés, la protéine se localise dans le noyau et dans le cytoplasme (**Figure 3**) et cela malgré sa masse moléculaire. Cela indique que la protéine W mutée pour le NLS_spé se concentre dans le cytoplasme du fait de son NES et non à cause de sa masse moléculaire. Puisqu'elle ne peut pas entrer dans le noyau de façon passive, cela indique également qu'un autre signal lui permettrait de rentrer dans le noyau quand le NES et le NLS_spé sont mutés. Ces premières données sont en conformité avec la mention dans des études précédentes d'un deuxième signal d'import nucléaire (Shaw et al. 2005 ; Audsley et al. 2016). Ainsi la W n'est pas exclusivement nucléaire, comme elle a été initialement décrite (Shaw et al. 2004). Nos résultats sont en conformité avec la description d'un trafic nucléocytoplasmique complexe de W et la suggestion qu'elle circulerait continuellement entre le cytoplasme et le noyau avec une présence globalement plus importante dans le noyau (Audsley et al. 2016). Curieusement, la comparaison des marquages de la W et ceux des noyaux (**Figures 2** et **3**) suggère que la W reste en périphérie du noyau. Ceci n'a jamais été rapporté et les études précédemment citées ne montrent pas de marquage du noyau en présence de W (Shaw et al. 2004 ; Shaw et al. 2005 ; Audsley et al. 2016) et/ou n'ont pas été réalisées à l'aide d'un microscope confocale. Cette observation concorderait avec une circulation continuelle de la W entre le cytoplasme et le noyau.

Afin de localiser précisément le NLS_com (localisé dans le NTD commun à P, V et W), les résultats de deux outils de prédiction disponibles sur internet ont été confrontés (**Tableau 1**). Les deux outils détectent le NLS déjà identifié dans le CTD (NLS_spé) et un autre signal

putatif dans le NTD, situé entre les positions 318 et 350, qui pourrait correspondre au NLS_com. Le premier outil cantonne ce deuxième signal entre les positions 323 et 332, alors que le deuxième outil prédit ce deuxième NLS comme bipartite et localisé plus largement entre les positions 318 et 350. Pour déterminer le rôle de ce signal putatif (pouvant correspondre au NLS_com), les résidus basiques K323, R324, R343 et K347 ont été mutés en alanine (selon le même rationnel que Shaw et al. 2005) dans la protéine WmNESmNLS dont la localisation est majoritairement nucléaire. En effet, les résidus basiques d'un NLS sont essentiels à l'interaction entre NLS et importines (Freitas et Cunha 2009). Les protéines WmNESmNLS ainsi mutées (K323A;R324A ou R343A;K347A ou K323A;R324A; R343A;K347A) restent présentes dans le noyau (**Figure 4**) et cela malgré leur masse moléculaire. Ceci semble suggérer qu'un autre signal, distinct de celui prédit entre les positions 318 et 350, est impliqué dans la localisation nucléaire de W quand le NES et le NLS_spé sont non fonctionnels. Afin de déterminer si les résidus basiques K323, R324, R343 et K347 pourraient néanmoins être impliqués dans l'import nucléaire des protéines P, V et W, le NES de la protéine V a été muté. De façon intéressante, la protéine VmNES ne se localise pas dans le noyau des cellules HeLa (**Figure 5**), contrairement à ce qui a été publié en cellules 2fTGH (Rodriguez et al. 2004). A noter cependant que Rodriguez et al. obtiennent une relocalisation nucléaire quasi complète de V dans les cellules 2fTGH traitées avec de la Leptomycine B (LMB, un inhibiteur spécifique de l'exportine 1), alors que la relocalisation nucléaire de V dans des cellules VERO traitées avec la LMB est beaucoup plus faible (Audsley et al. 2016). Ainsi le caractère fonctionnel du NLS_com pourrait dépendre du type cellulaire (par exemple si les cellules ont différents niveaux d'expression de l'importine α1). Enfin, la différence entre la relocalisation nucléaire de la protéine V et celle de la protéine WmNLS dans des cellules VERO traitées avec la LMB suggère que la relocalisation nucléaire de ces protéines n'est pas uniquement régie par le NLS_com présent dans le NTD commun (Audsley et al. 2016).

Les deux outils prédisent également un troisième signal d'import situé au début du CTD de W, qui pourrait être associé en NLS bipartite au NLS_spé déjà identifié. D'après Audsley et al. en 2016, ces résidus basiques du CTD interagiraient avec l'importine α1. Ces résidus basiques ont été précédemment déterminés comme non nécessaires pour l'import nucléaire médié par le NLS_spé du CTD (Shaw et al. 2005). Mais les données publiées ne permettent pas de déterminer s'ils sont suffisants pour l'importation nucléaire, du fait des autres sites d'import et d'export situés dans la W. En effet, il a été suggéré que les résidus basiques situés au début du CTD spécifique de W (organisés en NLS bipartite ou non) pourraient être suffisants dans l'import nucléaire de W quand le NES n'est pas fonctionnel (Shaw et al. 2005 ; Audsley et al. 2016). Ces données sont en conformité avec nos observations et les résultats des outils de prédiction, puisque la différence de localisation des protéines VmNES et WmNESmNLS suggère qu'un autre signal d'import est porté exclusivement par W et donc présent dans le CTD de W. L'implication des premiers résidus basiques du CTD de W dans sa localisation nucléaire, quand le NES et le NLS_spé sont non fonctionnels, est donc une hypothèse à explorer.

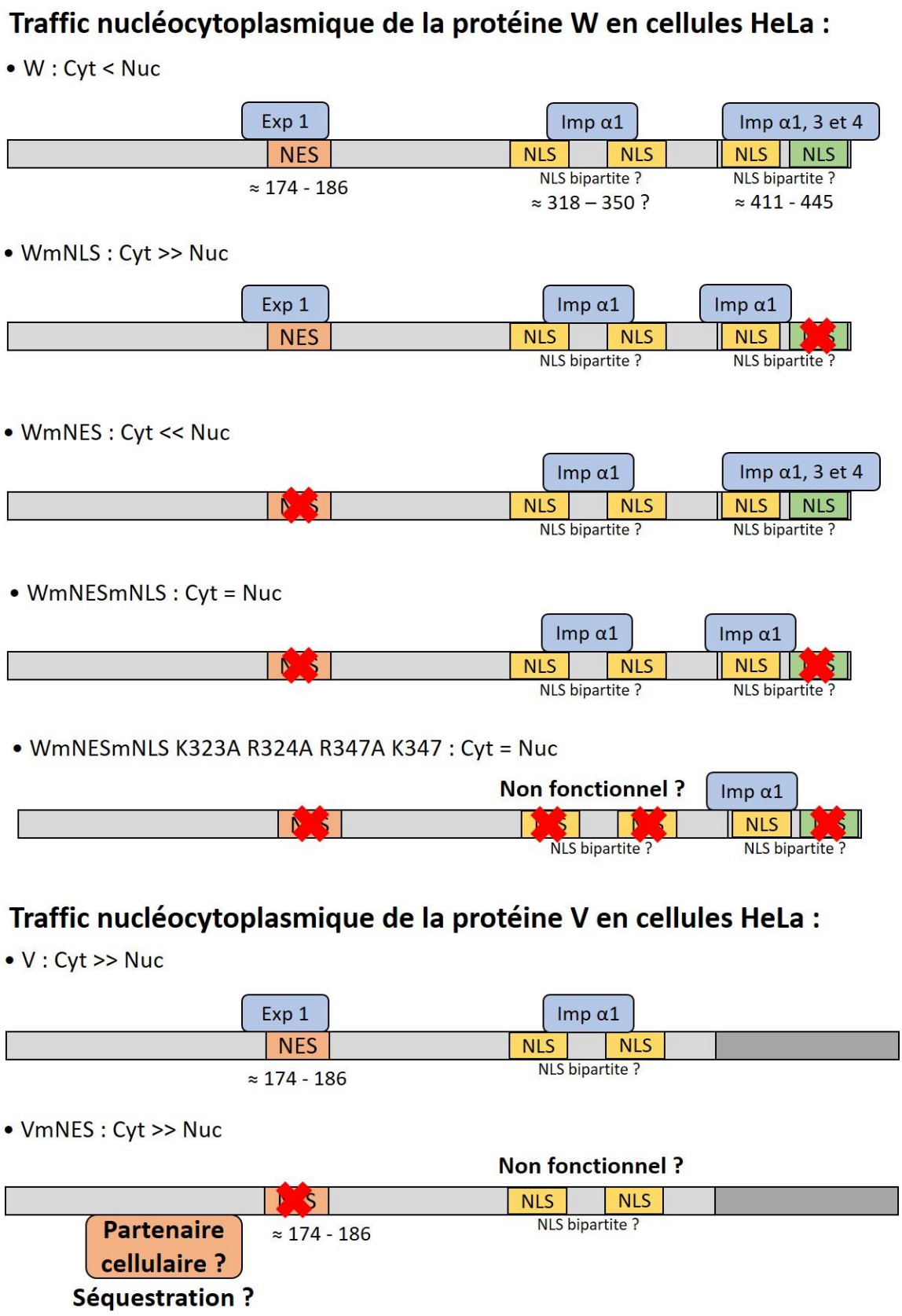


Figure 6 : *Résumé des différentes hypothèses formulées et observations faites dans cette partie. En plus de ce qui a précédemment été décrit, la relocalisation nucléaire de WmNESmNLS serait due à un signal dans son CTD. Le signal précédemment suggéré dans le NTD commun à P, V et W ne serait pas fonctionnel en cellules HeLa (sans exclure la possibilité que la protéine VmNES soit retenue dans le cytoplasme par un partenaire cellulaire).*

L'ensemble des hypothèses formulées et des observations faites dans cette partie a été résumé dans la **Figure 6**. Dans nos cellules HeLa, l'implication des résidus K323, R324, R343 et K347 (résidus basiques de la prédiction du NLS_com) a été écartée pour la relocalisation nucléaire de WmNESmNLS. Du fait que le NLS_com ne semble pas fonctionnel dans les cellules HeLa, rien ne permet de conclure qu'ils ne font effectivement pas partie du NLS_com fonctionnel dans d'autres types cellulaires. La localisation du NLS_com dans la **Figure 6** a donc été suggérée au niveau de ces résidus, puisqu'ils constituent toujours une hypothèse valide. On peut également envisager que les résidus K323, R324, R343 et K347 fassent partie d'un NLS fonctionnel de la protéine V en cellules HeLa, mais qu'un partenaire cellulaire séquestre la protéine dans le cytoplasme malgré ce signal d'import (STAT1 par exemple).

Dans certains types cellulaires (HeLa, VERO, HEK293T, M17), la W semble se localiser majoritairement dans le noyau, alors que dans d'autres (cellules endothéliales HULEC, LYMEC, HUVEC), elle serait majoritairement cytoplasmique (Lo et al. 2010). Ainsi, en fonction du niveau d'expression cellulaire de ces différents partenaires, la protéine W pourrait se localiser plus ou moins dans le noyau. Or, certains effets fonctionnels de W sont dépendants de sa localisation nucléaire (Shaw et al. 2005 ; Lo et al. 2010). De plus amples recherches pourraient permettre de déterminer où se localise majoritairement la W dans les différents types cellulaires (par quantification de la part nucléaire et cytoplasmique de W). Ces résultats pourraient être mis en relation avec les niveaux d'expression des importines et exportine interagissant avec W. Ces données contribueraient à la compréhension du rôle de la protéine W pour la dissémination de NiV à travers les différents types cellulaires de son hôte.

IV. DEVELOPPEMENT D'OUTILS *in vitro* POUR L'ETUDE DE L'HOTE NATUREL DE NiV ET RESULTATS PRELIMINAIRES

« Les travaux présentés dans cette partie ont été conduits dans le but d'étudier l'infection de l'hôte naturel de NiV, les chauves-souris de la famille des Pteropodidae. En tant que vétérinaires, Kévin Dhondt et moi-même sommes à l'initiative de ce projet, et particulièrement à l'origine de la récupération des échantillons biologiques et du développement des lignées cellulaires. Par la suite, d'autres membres de l'équipe nous ont rejoint : Noémie Aurine et Julien Fouret. A noter également la participation d'Isabelle Grosjean de la plateforme CelluloNet. Les résultats préliminaires présentés ci-après sont ceux auquels j'ai participé et font état des résultats obtenus à la fin de mon engagement sur cet axe de recherche. Ces travaux sont actuellement poursuivis dans le cadre de la thèse de Noémie Aurine. »

A. Introduction

L'ordre des chiroptères est à part des autres mammifères dans le sens où il regroupe les seuls mammifères volants. Cette capacité de vol a nécessité de nombreuses adaptations, notamment du métabolisme et du système immunitaire, du fait de l'élévation du stress oxydatif liée à cette activité musculaire. En outre, les chauves-souris sont les hôtes naturels de nombreux virus (virus de la rage, Ebola, Marburg, NiV, HeV, etc…) hautement pathogènes pour les autres mammifères, alors qu'elles-mêmes sont asymptomatiques lors de ces infections. Comprendre les mécanismes leur permettant de contrôler ces infections virales nécessite d'étudier les relations entre les chauves-souris et leurs pathogènes, et les caractéristiques éventuellement particulières de leur système immunitaire. L'état actuel des connaissances a été résumé dans une revue présentée en annexe (Enchéry et Horvat 2017). L'étude de l'infection de NiV chez son hôte naturel est de première importance pour la compréhension de la pathogénie de NiV chez un hôte accidentel. En effet, l'hypothèse que le fort pouvoir pathogène des Henipavirus chez les hôtes accidentels résulterait de l'adaptation de ces virus au système immunitaire particulier des chauves-souris frugivores, lui-même modelé par l'adaptation au vol, reste à ce jour la principale hypothèse. Cependant, très peu de données sont actuellement disponibles pour étayer cette hypothèse, en partie dû au fait que très peu d'outils *in vitro* ont été développés pour l'étude des chauves-souris frugivores.

Cette partie détaille le développement de lignées cellulaires de *Pteropus giganteus*, espèce présente au Bangladesh et en Inde, et réservoir de NiV (Yadav et al. 2012 ; Hahn et al. 2014). Ces lignées seront mises en œuvre pour présenter des résultats préliminaires de cinétique d'infection des cellules de chauves-souris par les deux différentes souches de NiV (NiV-M et NiV-B). Enfin, la compatibilité d'anticorps commerciaux disponibles pour l'étude des voies JAK/STAT et NF-κB chez la chauve-souris sera présentée.

B. Matériel et méthode

1. Cultures cellulaires

Le développement de lignées cellulaires de *Pteropus giganteus* a nécessité la récolte de prélèvements biologiques. Pour ce faire, une recherche des zoos européens, ayant cette espèce parmi leurs animaux, a été effectuée. Deux zoos ont été contactés : le zoo de Peaugres (en France) et le zoo de Vienne (en Autriche). Les prélèvements biologiques consistaient en des échantillons de membrane alaire (prélèvements non invasifs réalisés au biopsie punch sur animaux vigils lors des soins), de testicule (prélèvements réalisés sur animaux anesthésiés lors d'une campagne de castration au zoo de Peaugres) ou de poumon (prélèvements réalisés au cours d'une autopsie sur un animal retrouvé mort dans son enclos au zoo de Vienne). Les prélèvements biologiques issus de chauves-souris *Pteropus* ont été réalisés le plus aseptiquement possible et lavés avec du PBS stérile. Les échantillons ont ensuite, soit été conservés sur glace pour les trajets courts (Peaugres), soit congelés dans du milieu Cry-SFM (PromoCell) pour les trajets long (Vienne) et conservés à -80°C.

Tableau 1 : *Composition des différents milieux utilisés pour l'obtention de lignées primaires.*

Milieu 1	
Composants	**Concentration finale**
DMEM F-12	-
SVF	10%
Pénicilline Streptomycine	1%
L-glutamine	1%
+/- Amphotéricine B	2,5 µg/ml
Milieu 2	
Composants	**Concentration finale**
DMEM F-12	-
SVF	10%
Acides aminés non essentiels	1%
Sodium Pyruvate	1%
HEPES	1%
L-glutamine	1%
Gentamycine	6%
+/- Amphotéricine B	2,5 µg/ml
Milieu 3	
Composants	**Concentration finale**
DMEM F-12	-
SVF	10%
Acides aminés non essentiels	1%
Sodium Pyruvate	1%
L-glutamine	1%
Pénicilline Streptomycine	1%
β-Mercaptoéthanol	0,1 mM
IL-6	1 ng/ml
IL-6R	1 ng/ml
mouse Stem Cell Factor	1 ng/ml
Insulin-like Growth Factor	5 ng/ml
Leukemia Inhibitory Factor	-
+/- Amphotéricine B	2,5 µg/ml

Pour l'obtention de lignées primaires, les différents échantillons ont été fractionnés à l'aide de lames de scalpel stériles dans une boite de pétri. Les broyats ont été déposés dans différents milieux de culture (**Tableau 1**) et incubés à 37°C, 5% de CO_2. Le milieu utilisé a été remplacé régulièrement et les cultures ont été inspectées pour observer la colonisation des boîtes par des cellules primaires à partir des broyats. Les lignées primaires obtenues ont été amplifiées et congelées à -80°C dans du SVF inactivé (30 min à 56°C) + 10% DMSO.

Après amplification, une partie des lignées primaires de membrane alaire a été gardée en culture et cultivée sur milieu DMEM GlutaMAX (Life Technologies) (+ 10% SVF inactivé (30 min à 56°C) + 10 mM HEPES (Life Technologies) + 6% Gentamycine (Life Technologies)) immortalisée à l'aide de lentivecteurs Large T de SV40 (plateforme de vectorologie AniRA, $3{,}55.10^7$ IU/ml) et hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) (ABM, cat G200, 10^6 IU/ml), puis clonée. Les différents clones ont été évalués pour la stabilité de leurs morphologies cellulaires et leurs transfectabilités avec des kits commerciaux disponibles dans notre équipe.

2. Vérification de l'espèce des chauves-souris prélevés

Les cellules primaires et immortalisées de chauves-souris obtenues des différents zoos ont été lysées (10^6 cellules par échantillon) et l'ADN a été récolté à l'aide du kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). Des amorces ont été designées dans les régions homologues des séquences D-loop de plusieurs chauves-souris *Pteropus* : sens = CCCTATGTAATTCGTGCATAA et antisens = CCTGAAGAAAGAACCAGA. La séquence d'ADN mitochondriale correspondant à D-loop dans les différents échantillons a été amplifiée par PCR, purifiée et envoyée pour séquençage. Les résultats des séquençages ont été insérés dans un arbre phylogénétique généré par la méthode de « Neighbor Joining » (après alignement des séquences), grâce au logiciel Seaview 4, avec différentes séquences de D-loop de *Pteropus giganteus, P. alecto et P. vampyrus* disponibles (numéro d'accession KF726143.1, FJ548607.1, FJ548606.1, FJ548605.1, FJ548577.1, FJ548578.1 et FJ816783.1). L'arbre a été raciné à l'aide d'une séquence de D-loop de cheval (KT757761.1).

3. Infection avec NiV-M et NiV-B

Les infections des cellules de chauves-souris ont été réalisées selon la même méthode que celle décrite dans la partie « II. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W ». Brièvement, la quantité adéquate de virus a été mise en contact avec les cellules dans le milieu de culture sans SVF pendant 1h. Puis, le milieu d'infection a été remplacé par le milieu de culture habituel supplémenté en SVF (mais sans peptide inhibiteur de fusion). Le virus NiV-M (7 passages en cellule VERO) vient de l'isolat UMMC1 (numéro d'accession AY029767) et le virus NiV-B (3 passages en cellules VERO) a été isolé à partir d'un écouvillon de la gorge d'un patient (numéro d'accession SPBLOG# 200401066).

4. RT-PCR quantitative

L'ARN des cellules infectées a été isolé à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) en utilisant le tampon de lyse RLT selon les recommandations du fabriquant. Le mix de RT-PCR a été préparé avec 0,5 µg d'ARN total et en utilisant des amorces oligo(dT), « random hexamer » oligonucléotide du kit iScript cDNA synthesis (Bio-Rad) (pour la détection de la N et la GAPDH) ou une amorce antisens spécifique (pour la détection du génome virale). La RT-PCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur Biometra T-Gradient PCR. Les ADN complémentaires obtenus ont été dilués à 1/10. Le mix de PCR quantitative a été préparé avec les ADN complémentaires dilués en utilisant le kit Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). La PCR quantitative a été réalisée sur StepOne plus PCR system (Applied Biosystems), avec le programme suivant : 95°C pendant 5 min et 40 cycles alternant 95°C pendant 15 sec et 60°C pendant 1 min, suivis d'une courbe de fusion jusqu'à 95°C par étape de 0,8°C. Pour chaque échantillon, la PCR quantitative a été réalisée en duplicate (sauf pour les conditions « NiV génome » et « NiV N » en cellules de poumon, où les deuxièmes puits ont été utilisés pour extraire les protéines (données non présentées)) et les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel StepOne software v2.1. Le gène de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisé comme gène de ménage pour normaliser les échantillons. Des points de références des différents gènes ont été ajoutés à chaque session de PCR quantitative pour vérifier la quantité et l'intégrité de l'ARN, ainsi que pour évaluer les variations entre les différentes sessions. Après normalisation, les résultats ont été exprimés en nombre de copies d'ARN du gène d'intérêt par µg d'ARN analysé.

Les amorces antisens spécifiques utilisées pour la réalisation de la RT-PCR sur les génomes viraux sont pour NiV-M et NiV-B : gtgatcaaagtgagaatgagctcctcagacgataacacaat et gtgatcaaagtgagaatgagcttctcgggcgataacacagt respectivement. Les amorces ensuite utilisées pour la qPCR sont : sens (identique pour les deux souches) = gtgatcaaagtgagaatgagct, antisens NiV-M = atgactaactaagagcaagag et antisens NiV-B = atgactaactaagagcaagat. Pour la détection de la protéine N : sens = ggcaggattcttcgcaaccatc et antisens = ggctcttgggccaatttctctg. Pour la détection de la GAPDH : sens = atcatccctgcttctact et antisens : aggtcagatccacaact.

Les qPCR présentées ci-après ont été réalisées par Noémie Aurine.

5. Immunofluorescence

La réalisation des immunofluorescences a été détaillée dans la partie « I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W », avec les anticorps anti-STAT1 et anti-p65 précédemment décrit dans la partie « II. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB par NiV V ». Pour observer la translocation nucléaire des facteurs de transcription, la stimulation des cellules a été réalisée à l'aide de TNFα ou IL-1β humain à 10 ng/ml (PeproTech) ou à l'aide de 1000 U/ml d'IFNα universel (PBL Assay Science 11200) pendant 30 min.

C. Résultats

1. Développement de lignées cellulaires de *Pteropus giganteus*

L'espèce *Pteropus giganteus* a été spécifiquement choisie pour ses liens potentiels avec les épidémies de NiV (Yadav et al. 2012 ; Hahn et al. 2014). Les échantillons du zoo de Peaugres (en France) consistaient en des échantillons de membrane alaire et de testicule, et ceux du zoo de Vienne (en Autriche) en des échantillons de membrane alaire et de poumon.

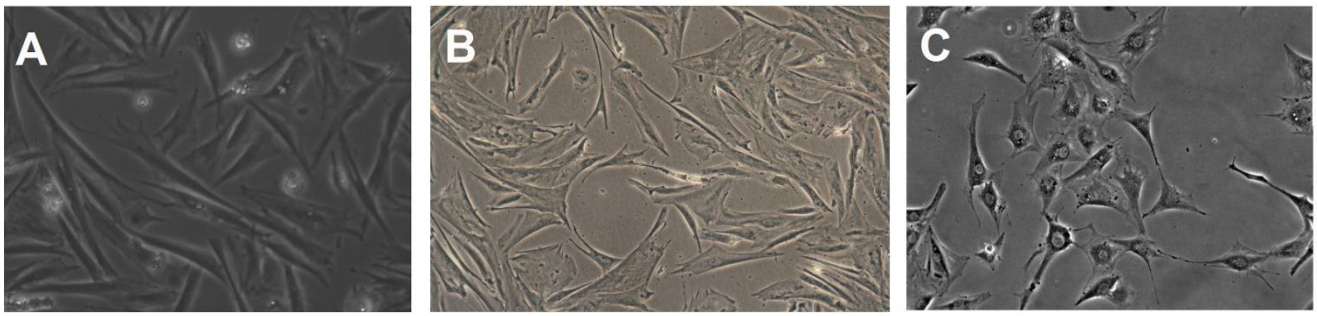


Figure 1 : *Photo des lignées cellulaires obtenues à partir des échantillons provenant du zoo de Vienne.* ***A :*** *Culture primaire de cellules issues de membrane alaire.* ***B :*** *Culture primaire de cellules issues de poumons (les cultures de cellules primaires de poumon ont été réalisée par Noémie Aurine).* ***C :*** *Culture de cellules immortalisées (PATGV1.12) avec hTERT et LargeT issues de la culture primaire issue de membrane alaire.*

Les prélèvements effectués ont été fractionnés et mis en culture dans différents milieux. Des cellules primaires ont commencé à coloniser les boîtes de pétri, à partir des différents échantillons (membrane alaire, testicule et poumon), après 1 à 2 semaines de culture. Les cellules obtenues étaient de type fibroblastique (**Figures 1A et 1B**). Elles ont été congelées pour la constitution de stock. L'immortalisation des cellules primaires issues de la membrane alaire a été confirmée par la détection des inserts hTERT et LargeT par PCR. Après leur immortalisation, ces cellules ont été nommées (PATGV1) et clonées. A noter le changement de morphologie apparu dans ces cellules après immortalisation **(Figure 1A** (avant) **et 1C** (après)). Les clones ont ensuite été sélectionnés en fonction de leur temps de doublement et leur transfectabilité avec les kits commerciaux disponibles dans notre laboratoire. Le clone PATGV1.12 a été retenu sur ces deux critères, même si le taux de transfection de ces cellules restait faible (environ 10% avec JetPrime).

La traçabilité des individus en zoo n'étant pas disponible, les différentes espèces de *Pteropus* étant difficiles à distinguer sur des critères morphologiques et compte-tenu de la possibilité d'accouplement d'individus de différentes espèces dans les volières, les espèces des chauves-souris prélevées ont été déterminées génétiquement. Pour ce faire, les séquences d'ADN mitochondriale D-loop ont été séquencées à partir des différentes cultures cellulaires obtenues. La séquence de D-loop est largement utilisée chez de nombreux animaux, comme marqueur des variations inter-espèces et pour la compréhension de l'évolution des systèmes (Sziszkosz et al. 2016 ; Chen et al. 2016 ; Sultana et al. 2016). Les

séquences obtenues ont été alignées avec des séquences disponibles sur internet pour d'autres espèces de *Pteropus* et un arbre phylogénétique a été construit par la méthode du neighbor-joining (**Figure 2**). Alors que les échantillons issus du zoo de Vienne sont dans le taxon de *Pteropus giganteus*, celui issu du zoo de Peaugres se situe entre le taxon de *Pteropus giganteus* et de *Pteropus vampyrus*. Le vétérinaire du zoo de Peaugres avait en effet suggéré que ces individus pouvaient être issus de croisements entre *Pteropus giganteus* et *Pteropus lylei* (aucune séquence de D-loop de *Pteropus lylei* n'est disponible sur internet). Les cellules issues des échantillons du zoo de Peaugres ont été conservées, mais écartées des manipulations expérimentales en attendant une meilleure caractérisation.

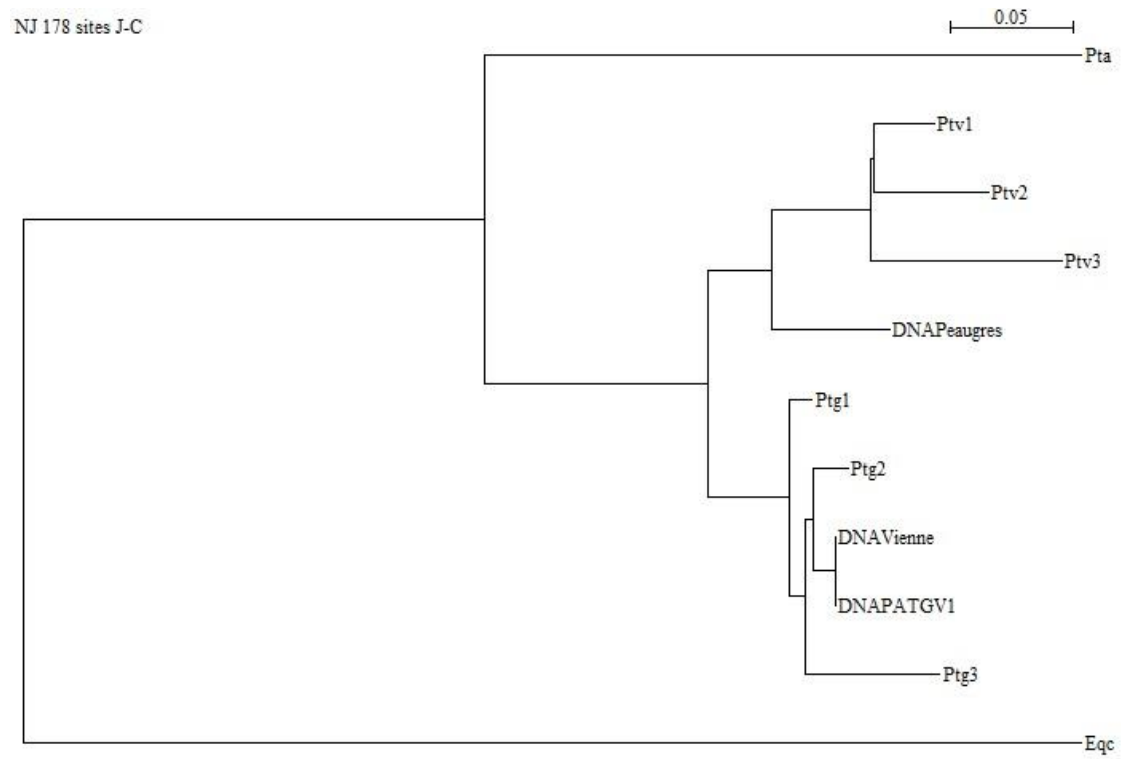


Figure 2 : *Arbre phylogénétique basé sur la séquence d'ADN mitochondriale D-loop obtenu par la méthode du neighbor-joining. Abréviations : Pta = Pteropus alecto, Ptv = Pteropus vampyrus, Ptg= Pteropus giganteus, Eqc = Equus caballus. Les séquences correspondantes de l'ADN des cellules primaires issues du zoo de Peaugres (DNAPeaugres) et du zoo de Vienne (DNAVienne), ainsi que l'ADN issu des cellules immortalisées (DNAPATGV1) ont été également intégrées dans cet arbre.*

2. Cinétique d'infection des cellules de chauves-souris par NiV

Les cellules immortalisées PATGV1.12 (**Figure 1C**) et les cellules primaires de poumon (**Figure 1B**) ont été infectées avec les deux souches de NiV, Malaisie (NiV-M) et Bangladesh (NiV-B). D'une façon générale, l'infection par NiV a entraîné peu d'effets cytopathiques dans ces cellules, comparés aux effets cytopathiques couramment observés dans des cellules humaines (Borisevich et al. 2017).

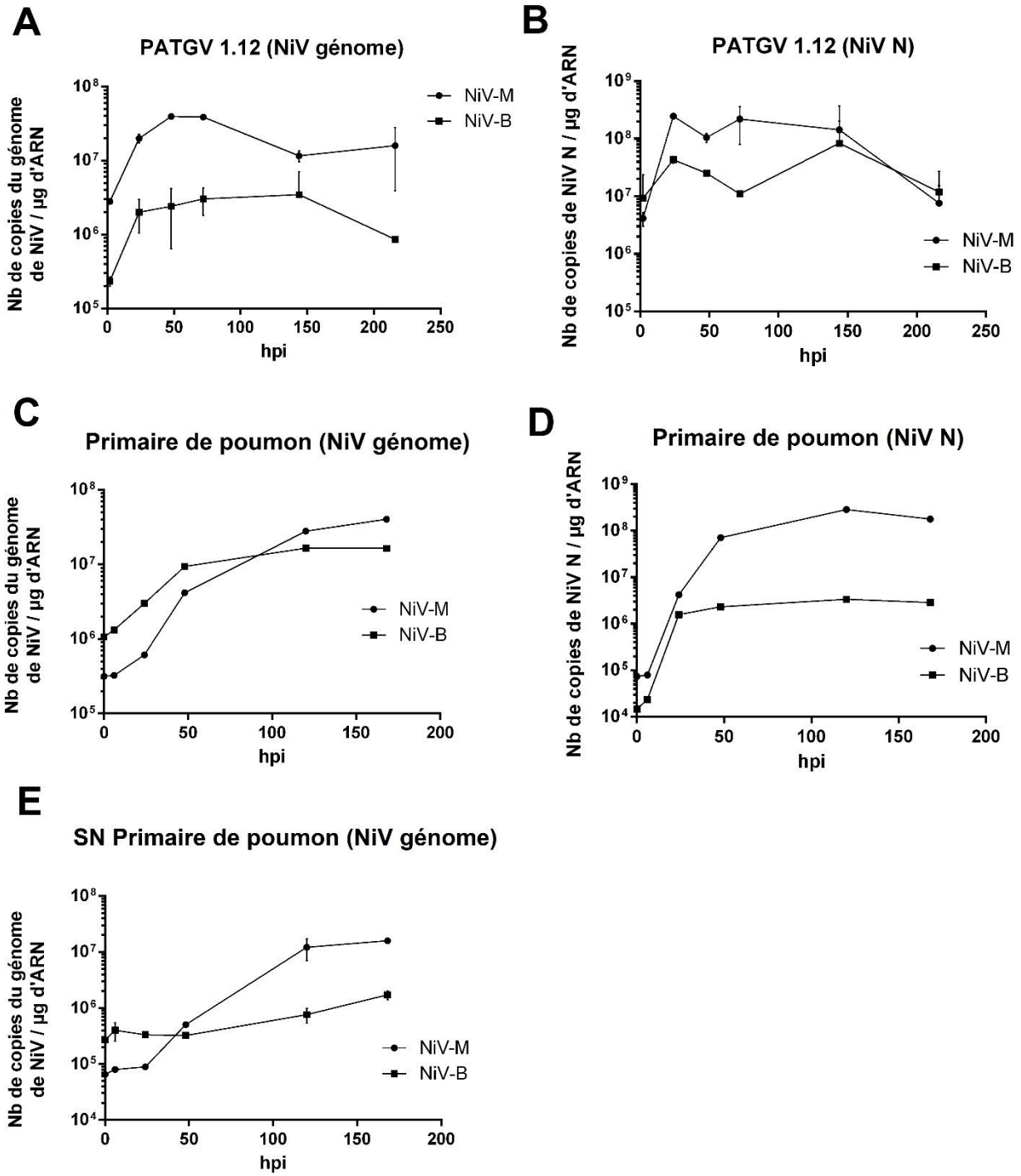


Figure 3 : *Cinétique d'infection des cellules de chauve-souris immortalisées PATGV12 et de cellules primaires de poumon par les virus NiV-M et NiV-B par qPCR (l'ensemble des qPCR présentées dans cette figure a été réalisé par Noémie Aurine).* ***A :*** *Evolution au cours du temps de la quantité d'ARN génomique de NIV-M et NiV-B dans des cellules PATGV1.12 infectées à MOI 5.* ***B :*** *Evolution au cours du temps de la quantité d'ARN de la nucléoprotéine de NIV-M et NiV-B dans des cellules PATGV1.12 infectées à MOI 5.* ***C :*** *Evolution au cours du temps de la quantité d'ARN génomique de NIV-M et NiV-B dans des cellules primaires de poumon infectées à MOI 3.* ***D :*** *Evolution au cours du temps de la quantité d'ARN de la nucléoprotéine de NIV-M et NiV-B dans des cellules primaires de poumon infectées à MOI 3.* ***E :*** *Evolution au cours du temps de la quantité d'ARN génomique de NIV-M et NiV-B dans le surnageant (SN) de cellules primaires de poumon infectées à MOI 3. Pour C et D, un des puits du duplicat a été utilisé pour réaliser une extraction protéique (données non présentées), les résultats à chaque temps sont donc des simplicats.*

Dans les cellules PATGV1.12, le nombre de copies d'ARN génomiques viraux augmente d'environ un log10 dans les premières 24h, atteint un maximum environ 50h après infection et décroit doucement lors des 150h suivantes (**Figure 3A**). Les deux souches présentent un profil similaire, bien que moins de copies d'ARN génomique de NiV-B soient détectées à T = 0h. Dans ces mêmes cellules, le nombre de copies d'ARN de la N de NiV-M augmente d'environ 2 log10 dans les premières 24h, atteint un maximum environ 50h après infection et décroit doucement lors des 150h suivantes (**Figure 3B**). Alors que le nombre de copies d'ARN de la N est relativement similaire entre NiV-M et NiV-B à T = 0h, l'augmentation dans les 1ères 24h est plus limitée pour NiV-B (moins d'un log10).

Dans les cellules primaires de poumons, le nombre de copies d'ARN génomiques viraux augmente progressivement pour atteindre 150h après infection une augmentation d'environ 2 log10 pour NiV-M et d'un log10 pour NiV-B, par rapport au nombre de copie à T = 0h (**Figure 3C**). La détection du nombre de copies d'ARN génomiques viraux dans le surnageant de ces cellules présente un profil similaire (**Figure 3E**). Le nombre de copies d'ARN de la N de NiV-M augmente d'environ 3 log10 dans les premières 50h et reste stable lors des 125h suivantes, alors que le nombre de copies d'ARN de la N de NiV-B augmente d'environ 2 log10 dans les premières 24h et reste stable lors des 150h suivantes (**Figure 3D**).

3. Compatibilité des anticorps commerciaux pour l'étude des voies de signalisation

Outre le développement de lignées originales de chauve-souris, une étude de l'immunité innée à l'échelle moléculaire nécessite des outils (anticorps, etc..) adaptés à l'espèce. Les cellules PATGV1.12 ont été testées pour les différentes techniques utilisées en routine dans notre laboratoire. Par rapport aux autres clones de PATGV1 obtenus, ces cellules présentent la meilleure transfectabilité avec les kits commerciaux disponibles (notamment le JetPrime®), même si elle reste faible (10% des cellules) et variable. Ainsi, ces cellules ne peuvent pas être utilisées en tests fonctionnels qui requièrent un taux de transfection élevé des cellules pour tester différents plasmides. Néanmoins, elles peuvent être utilisées en immunofluorescence où leur taux de transfection faible permet malgré tout de visualiser de nombreux événements pour une même condition. La séquestration de STAT1 par NiV V dans le cytoplasme des PATGV 1.12 a été investiguée en utilisant un anticorps anti-STAT1 disponible dans le commerce. L'anticorps utilisé reconnait une protéine, qui se distribue uniformément dans le cytoplasme et le noyau en l'absence de stimulation (**Figure 4**). Après une stimulation à l'interféron de type 1 humain pendant 30 minutes, la protéine marquée se concentre dans le noyau des cellules, sauf en présence de NiV V où elle reste quasi exclusivement dans le cytoplasme (**Figure 4**). Ces résultats suggèrent que notre anticorps commercial reconnait bien STAT1 de *Pteropus giganteus* et que la voie de réponse à l'IFN de type 1 est fonctionnelle et activable par l'interféron humain de type 1 commercial dans les cellules PATGV 1.12.

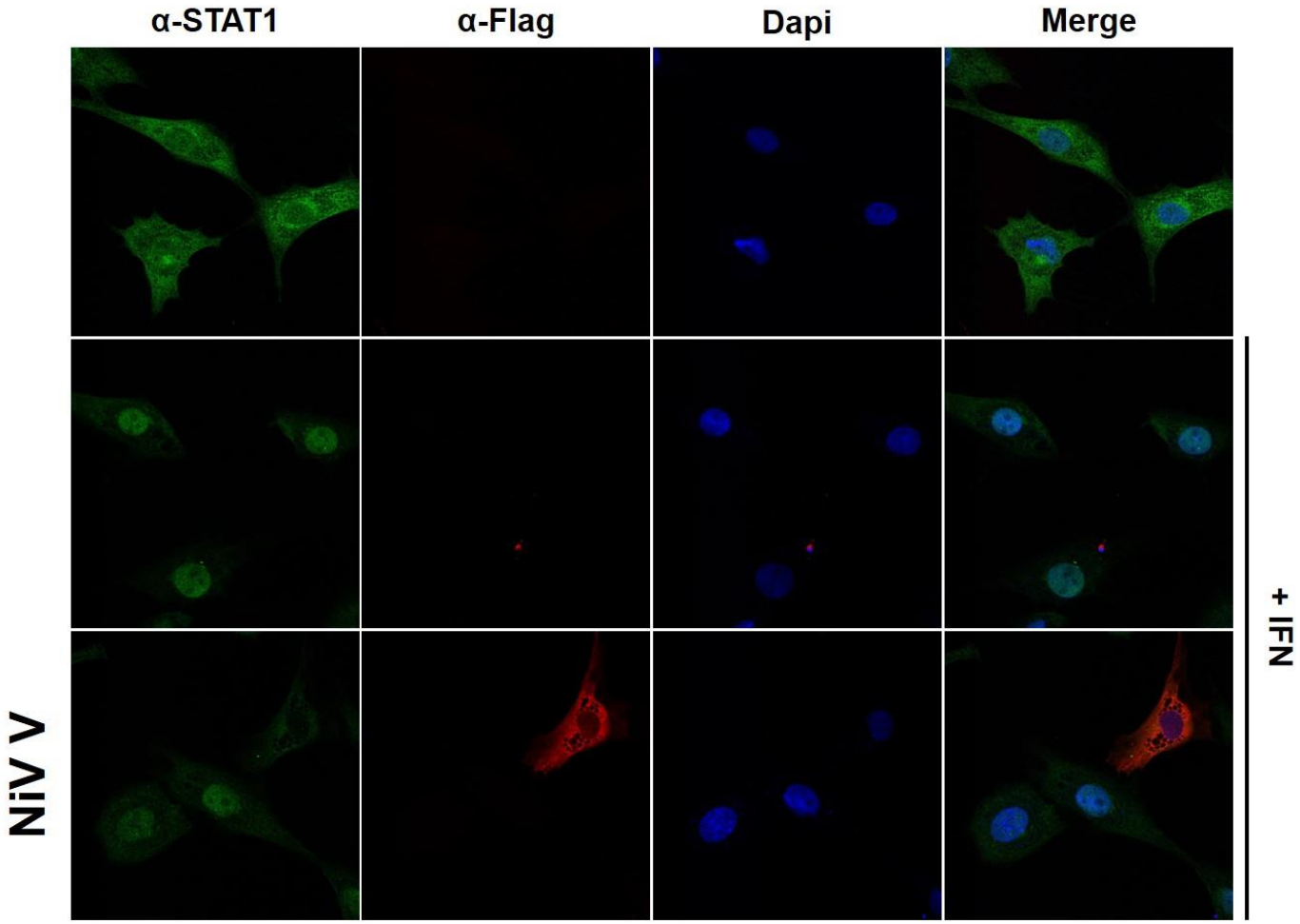


Figure 12 : *Séquestration de la protéine STAT1 par la protéine V de NIV dans le cytoplasme de cellules de chauve-souris (par immunofluorescence). Un plasmide codant pour la protéine V de NIV étiquetée Flag ou un vecteur vide (EV, utilisé comme contrôle) ont été transfecté dans des cellules PATGV1.12. 20h après transfection, les cellules ont été stimulées ou non, selon les conditions, pendant 30 minutes avec de l'interféron de type 1 humain (1000 U/ml), fixées et perméabilisées. Les protéines ont été marquées avec un anticorps de souris anti-Flag et un anticorps de lapin spécifique anti-STAT1. Elles ont ensuite été marquées avec des anticorps anti-souris et anti-lapin Alexa 555 et Alexa 488 respectivement. Les noyaux ont été marqués avec du Dapi. Les images présentées sont représentatives des photos obtenues pour chaque condition.*

De la même façon, les cellules PATGV1.12 ont été testées pour savoir si la voie canonique NF-κB était fonctionnelle en utilisant un anticorps anti-p65 disponible dans le commerce. L'anticorps utilisé reconnait une protéine, qui est majoritairement présente dans le cytoplasme, bien qu'également présente dans le noyau (**Figure 5**). Après une stimulation avec du TNFα ou de l'IL-1β humain pendant 30 minutes, elle se concentre dans le noyau des cellules. Ces résultats suggèrent que l'anticorps commercial utilisé reconnait bien la protéine p65 de *Pteropus giganteus* et que la voie canonique NF-κB est fonctionnelle et activable par le TNFα commercial dans les cellules PATGV1.12.

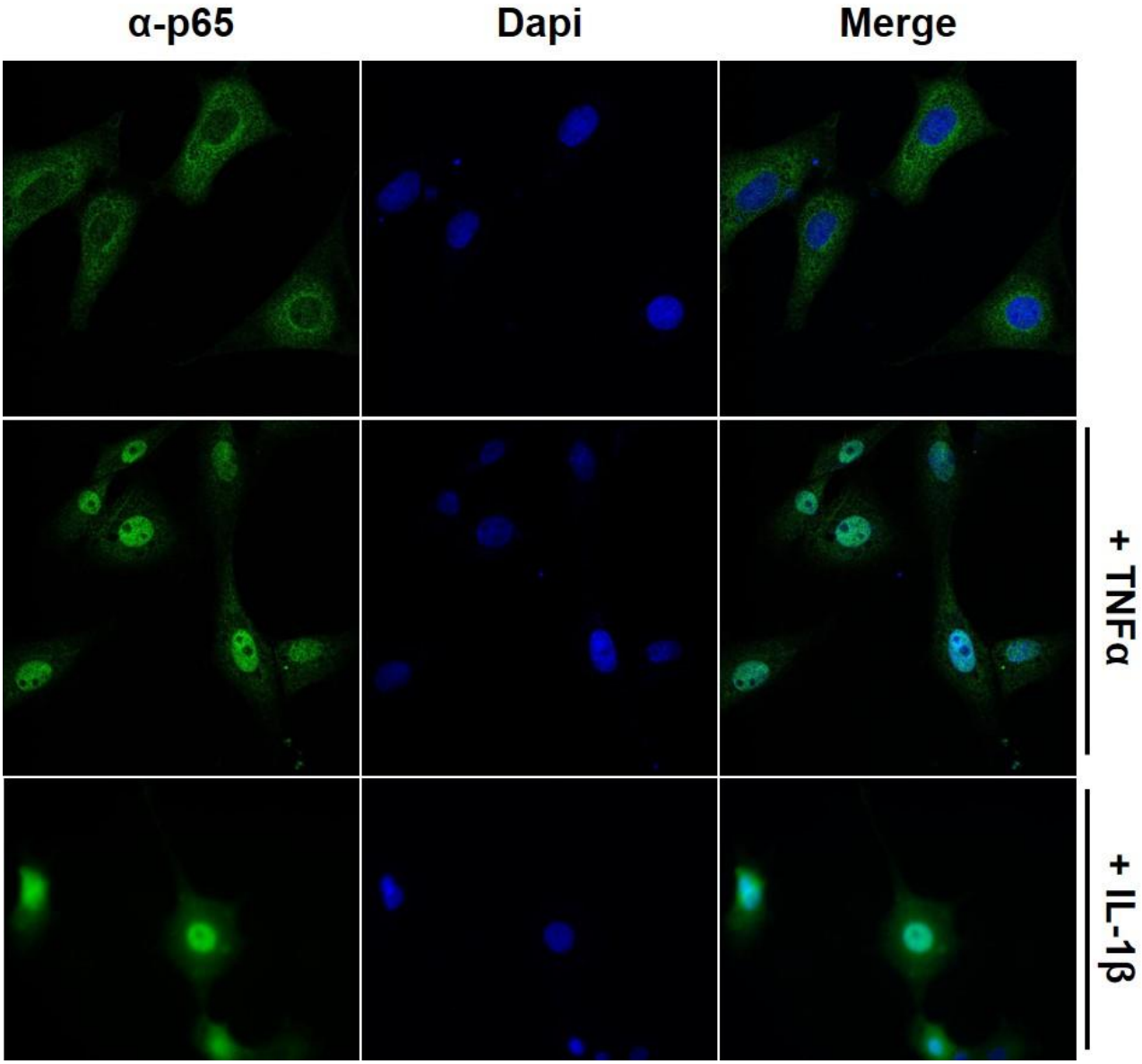


Figure 5 : *Validation du marquage anticorps anti-p65 et de la stimulation avec TNFα dans des cellules de chauve-souris (par immunofluorescence). Des cellules PATGV1.12 ont été stimulées ou non, selon les conditions, pendant 30 minutes avec du TNFα ou de l'IL-1β humain (10 ng/ml), fixées et perméabilisées. Les protéines ont été marquées avec un anticorps de lapin anti-p65. Elles ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-lapin Alexa 488. Les noyaux ont été marqués avec du Dapi. Les images présentées sont représentatives des photos obtenues pour chaque condition. Uniquement les conditions non stimulée et stimulée avec TNFα ont été réalisées avec un microscope confocale.*

D. Conclusion de la partie IV.

La technique de culture cellulaire employée pour le développement de lignées cellulaires de *Pteropus giganteus* est à la fois simple et efficace. Elle a permis en l'espace d'un peu plus de 8 mois d'obtenir un stock conséquent de cellules primaires et des lignées immortalisées stables. Le séquençage de la séquence D-loop a permis de confirmer que les individus prélevés au zoo de Peaugres n'étaient pas de l'espèce *Pteropus giganteus*. Cependant, D-loop est une séquence d'ADN mitochondriale, qui est uniquement transmise par la mère. Ainsi, même si les individus prélevés au zoo de Vienne sont placés dans le taxon de *Pteropus giganteus* (**Figure 2**), les origines du père de l'individu restent à définir pour statuer définitivement de l'espèce. En outre, les cellules obtenues sont peu transfectables avec les kits commerciaux disponibles, ce qui limite leur utilisation dans des tests fonctionnels. Cependant, elles peuvent être utilisées en immunofluorescence (**Figures 4 et 5**). Les premiers résultats obtenus en cellules PATGV1.12 ont déjà permis de confirmer que les voies JAK/STAT et NF-κB (ou similaires) étaient fonctionnelles dans ces cellules. Deux anticorps disponibles dans le commerce, d'intérêt pour l'étude de ces voies, ont été identifiés comme reconnaissant possiblement STAT1 et p65 chez les *Pteropus*, ainsi que la possibilité d'utiliser du TNFα, de l'IL-1β et de l'IFN de type 1 humains pour activer ces mêmes voies. De plus, ces résultats suggèrent l'effet inhibiteur de NiV V sur STAT1 dans ces cellules, ce qui a déjà été confirmé dans des cellules de *Pteropus* (Virtue et al. 2011). De plus amples expérimentations (par exemple, vérification du profil d'expression des protéines reconnues par ces anticorps en western-blot) devraient permettre de confirmer ou non que les anticorps commerciaux utilisés reconnaissent bien STAT1 et p65 de *Pteropus giganteus*.

NiV entre dans les cellules de membrane alaire et de poumon obtenues, à MOI 3 et 5 respectivement, puisque la quantité d'ARN génomiques viraux augmente au cours du temps (**Figure 3**). Ces résultats permettent de mettre en évidence que les mécanismes de production d'ARNm et de réplication du génome sont fonctionnels dans ces cellules. Curieusement, des quantités d'ARN différentes entre NiV-B et NiV-M ont été détectées à T = 0h (**Figure 3A** par exemple). Cela suggère que soit un des deux stocks viraux a été altéré, soit les résulats de titration des stocks sont erronés (obtenus par comptage des plages de lyse), soit les particules virales de NiV-M et NiV-B n'embarquent pas les mêmes quantités d'ARN. L'augmentation de la quantité d'ARN génomiques viraux dans le surnageant cellulaire au cours du temps suggère également la production de particules virales à partir de ces cellules (**Figure 3E**). Mais de plus amples expérimentations sont nécessaires pour s'assurer que cette augmentation n'est pas due à une lyse des cellules infectées (par exemple, par détection d'ARNm de la cellule). Du fait de l'instabilité de la protéine F de NiV et de la quantité de virus utilisée pour les infections (MOI 3 et 5), d'autres expérimentations devraient être mises en place pour déterminer si l'entrée du virus dans ces cellules se fait selon le mécanisme précédemment mentionné. D'une façon intéressante, une comparaison des cinétiques de NiV-M et NiV-B dans les différentes lignées suggère que l'infection par NiV-M entraîne une production plus importante d'ARN viraux que l'infection par NiV-B (**Figure 3**). Ces résultats sont à considérer avec

précaution du fait du caractère très préliminaire de ces données et de la différence du nombre de passages en cellules VERO entre les deux virus. Le marquage des cellules avec des anticorps spécifiques de NiV après infection pourraient également permettre de déterminer par cytométrie en flux le taux d'infection de ces différentes lignées cellulaires. Des tests en cours dans notre équipe devraient permettre de mieux caractériser ces cellules (profile RNAseq, marquages fibro/epith/endoth, etc…) et de mieux caractériser leur infection par NIV-M et NiV-B. Sont également prévus des tests pour investiguer le déclenchement des défenses antivirales de ces cellules par NiV. A terme, ces résultats pourraient apporter des éléments supplémentaires pour la compréhension des différences de pouvoir pathogène des deux souches de NiV (Mire et al. 2016).

En plus des différents éléments cités ci-dessus (caractérisation de ces cellules et de leur infection par NiV), de nombreuses perspectives sont envisagées. Par exemple, compte-tenu de la difficulté d'accès aux échantillons biologiques de *Pteropus giganteus* et afin de pouvoir caractériser l'infection de NiV dans différents types cellulaires de chauves-souris, le développement de cellules souches pluripotentes induites (IPS) à partir des échantillons récoltés est en cours au sein de notre équipe. L'ensemble de ces travaux constitue le projet de thèse de Noémie Aurine.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Du fait de l'importance de la voie NF-κB dans de nombreux processus cellulaires, et particulièrement dans l'immunité, plusieurs familles de virus ont acquis diverses stratégies pour moduler cette voie de signalisation, que ce soit en l'activant ou en l'inhibant. Un exemple d'activation de NF-κB est la protéine Tax du virus T-lymphotropique humain (HTLV), qui interagit avec IKKγ pour activer directement l'IKK complexe (Terme et al. 2008; Journo et al. 2013; Pène et al. 2014). De nombreux exemples d'inhibition de NF-κB ont également été décrits, notamment au sein de l'ordre des *Mononegavirales* (dont NiV fait partie). Ainsi, parmi les *Pneumoviridae*, la protéine SH de RSV inhibe la voie NF-κB activée par TNFα (Fuentes et al. 2007). Parmi les *Rhabdoviridae*, les protéines de matrice M de plusieurs *Lyssavrus* inhibent NF-κB en interagissant avec RelAp43 (un variant d'épissage de RelA de 43 kDa, membre de la famille de NF-κB dépourvu de TAD mais capable de potentialiser la transactivation par p65) (Luco et al. 2012). Dans la même famille, la protéine M de VSV inhibe la voie NF-κB par un mécanisme localisé en amont de l'IKK complexe (Varble et al. 2016). Parmi les *Paramyxoviridae*, la protéine SH de MuV et de PIV5 présentent une fonction similaire à celle de la protéine SH de RSV (Fuentes et al. 2007 ; Xu et al. 2011) et la V de MeV séquestrerait p65 dans le cytoplasme (Schuhmann et al. 2011).

Nous avons démontré que NiV inhibe la voie NF-κB et que le CTD spécifique de la protéine W est nécessaire à cette inhibition. En contexte de transfection, W inhibe la voie NF-κB en aval de l'IKK complexe et en amont de p65 et sa localisation nucléaire est nécessaire à cet effet. Cette inhibition de NF-κB pourrait expliquer l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires dépendante de W lors de l'infection par NiV, mise en évidence par Satterfield et al. en 2015. Parmi les candidats interactants de W mis en évidence dans nos travaux, les protéines 14-3-3 sont impliquées dans la voie NF-κB (Schuster et al. 2011 ; Aguilera et al. 2016) et nous avons démontré qu'en contexte de transfection, W perturbe la localisation cellulaire de 14-3-3 d'une façon dépendante de sa localisation nucléaire. Des expérimentations sont en cours pour déterminer si oui ou non, les protéines 14-3-3 sont impliquées dans le mécanisme d'inhibition de la voie NF-κB par la protéine W de NiV. Les protéines 14-3-3 étant également impliquées dans d'autres mécanismes cellulaires, y compris dans le cytoplasme, l'effet de W sur ces protéines pourrait avoir d'autres conséquences. Par exemple, 14-3-3 ε est impliquée dans la stabilisation de l'interaction entre RIG-I et TRIM25, facilitant ainsi l'ubiquitination de RIG-I et le déclenchement de la production d'IFN de type 1 (Liu et al. 2012). Chan et Gack en 2016 ont démontré que l'interaction de 14-3-3 ε avec la protéine NS3 du virus de la dengue perturbait la voie de signalisation via RIG-I. D'une façon similaire, W pourrait perturber l'interaction RIG-I/TRIM25 en séquestrant 14-3-3 ε dans le noyau et ainsi limiter la production d'IFN de type 1. Autre exemple, 14-3-3 σ est décrit pour positivement réguler p53 (Yang et al. 2003) : 14-3-3 σ stabilise p53, limite son export nucléaire, favorise sa tétramérisation et facilite son activité transcriptionnelle. La localisation de 14-3-3 σ dans le noyau serait nécessaire à ses effets sur p53. Récemment, W a été décrite pour positivement moduler la voie p53 d'une manière dépendante de sa localisation nucléaire, mais indépendante de son interaction avec

STAT (Martinez-Gil et al. 2017). Le mécanisme permettant cette modulation n'a pas été détaillé, mais compte-tenu des éléments évoqués ci-dessus, 14-3-3 est un candidat pour expliquer cet effet de W sur p53. En outre, étant donné l'intrication des voies NF-κB et p53 , on ne peut pas exclure que l'effet de W sur NF-κB soit une conséquence de sa modulation de la voie p53 (Webster et Perkins 1999 ; Murphy et al. 2011).

Un effet inhibiteur de la voie NF-κB activée par IL-1β et TNFα a également été mis en évidence pour la protéine V de NiV en contexte de transfection. Contrairement à W, cet effet serait localisé en amont de TRAF6, ce qui implique un mécanisme différent de W. Cette conclusion est également soutenue par le fait que cet effet inhibiteur est dépendant du CTD spécifique de V. Les résultats présentés ont permis d'écarter l'hypothèse d'une séquestration de p65 dans le cytoplasme par interaction avec NiV V, contrairement à ce qui a été décrit avec la V de MeV, et également d'écarter l'hypothèse d'une implication d'UBXN1 dans le mécanisme de cette inhibition. Cet effet, même si reproductible, semble plus modéré que celui mis en évidence avec W. En effet, dans les mêmes conditions de stimulation, dans les mêmes cellules et avec le même système d'expression de la protéine, l'intensité de l'inhibition de V est plus faible que celle de W. De plus, l'intensité de l'inhibition de NF-κB par V observée dans nos travaux semble refléter l'intensité de son inhibition des cytokines mise en évidence par Satterfield et al. en 2015, qui là aussi est moindre que celle de l'inhibition de W. Il faut tout de même garder à l'esprit que l'intensité de l'inhibition par V peut être dépendante de différents paramètres, tels que le type de stimulation ou le type cellulaire. Ainsi, dans un autre contexte d'activation de la voie NF-κB, l'effet de V pourrait être plus fort. En outre, la possibilité que l'effet de V observé ici soit lié aux méthodes expérimentales utilisées (transfection par exemple), ne peut être écartée. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'à ce jour aucun partenaire de V impliqué dans la voie NF-κB n'a pu être mis en évidence. Ainsi, la priorité est de confirmer l'existence de cet effet inhibiteur en contexte d'infection, en utilisant un virus recombinant V(CTD)ko (non disponible actuellement dans notre équipe). Si cette inhibition est confirmée, de plus amples expérimentations seront nécessaires pour déterminer le mécanisme sous-jacent. Les résultats obtenus en contexte d'infection avec NiV W(CTD)ko montre que l'effet inhibiteur de NiV sur la voie NF-κB nécessite l'expression de W (pas de différence signifcative d'activation de la voie entre NiV WT et NiV W(CTD)ko). Ainsi, l'effet imputé à V seule sur la voie NF-κB en contexte d'infection, s'il existe, serait relativement limité par rapport à l'effet inhibiteur observé avec NiV WT. Cependant, même si les deux protéines V et W ont un effet inhibiteur quand elles sont exprimées seules, on ne peut écarter la possibilité que l'effet inhibiteur de la voie NF-κB par NiV soit la résultante d'une synergie des effets de V et W. L'évaluation de l'inhibition de la voie NF-κB lors d'une co-expression de V et W, ou lors d'une infection avec NiV V(CTD)ko permettrait de répondre à cette question.

A notre connaissance, c'est la première fois que des effets inhibiteurs spécifiques de la voie NF-κB sont décrits pour des protéines de NiV. Compte-tenu de l'importance de cette voie dans la réponse inflammatoire, les défenses anti-virales et le recrutement des leucocytes, ces effets inhibiteurs de V et W pourraient avoir d'importantes conséquences lors de l'infection

in vivo. En effet, la mortalité observée lors de l'infection de différents modèles animaux par des virus recombinants a permis d'acter que les protéines V et W sont impliquées dans le pouvoir pathogène de NiV et de définir un profil pour chacune d'entre elles (Mathieu et al. 2012 ; Yoneda et al. 2010 ; Satterfield et al. 2015, 2016) :

- V(CTD) ko = absence de mortalité quel que soit le modèle.
- W(CTD) ko = mortalité légèrement retardée dans le temps chez le furet ; mortalité dose-dépendante et propagation du virus plus lente dans les organes chez le hamster.

Le fort pouvoir pathogène de NiV et HeV (dépendant de leurs hôtes) étant une de leurs spécificités parmi les paramyxovirus, les virologistes essayent toujours d'établir un lien clair entre la virulence *in vivo* liée à V et W, et les mécanismes moléculaires de V et W décrits *in vitro*. Il convient de préciser pourquoi les mécanismes moléculaires décrits jusqu'à ce jour ne permettent pas de faire ce lien. Il convient également de détailler en quoi les effets inhibiteurs de NF-κB détaillés dans nos travaux pourraient permettre de faire le lien entre les différentes échelles cellulaire, tissulaire et organique lors de l'infection par NiV.

La protéine V a été décrite comme le déterminant majeur du pouvoir pathogène de NiV avec une capacité à inhiber les défenses antivirales et W comme un déterminant de la propagation du virus avec une capacité à contrôler la production de chimiokines. Le NTD commun à V, W et de P est impliqué dans la séquestration des protéines STAT1/2 et donc dans l'inhibition de la réponse à l'interféron. Les virus recombinants utilisés dans les études *in vivo* ne permettent pas d'impliquer ce mécanisme dans les différences observées entre les protéines. Par exemple, les virus V(CTD) ko utilisés produisent toujours les protéines P et W capables de séquestrer STAT1/2. De plus, ces virus produisent une protéine tronquée correspondant au NTD de V qui vraisemblablement garde la capacité de séquestrer STAT1/2. Afin de déterminer la part de ce mécanisme de séquestration de STAT1/2 par les produits du gène P dans la pathogénie de NiV, un NiV déficient pour la séquestration des protéines STAT devrait être utilisé *in vivo*. En outre, ce mécanisme ne constitue pas une spécificité de NiV puisqu'il est partagé par d'autres paramyxovirus. De plus, compte-tenu des virus recombinants utilisés, les différences observées entre V et W *in vivo* seraient donc essentiellement dues à leurs CTD respectifs (et n'impliquerait donc pas leur capacité à séquestrer STAT1/2). Le CTD de V est décrit pour inhiber la production d'IFN de type 1 via une inhibition de MDA5. Ce mécanisme moléculaire est en adéquation avec la capacité de V à inhiber les défenses antivirales en contexte d'infection. Mais l'importance de ce mécanisme de V pour le pouvoir pathogène de NiV n'a jamais été spécifiquement étudiée *in vivo*. A l'heure actuelle, la mortalité dépendante de V induite par NiV ne peut donc pas être reliée au mécanisme d'inhibition de MDA5. De plus, comme pour le mécanisme STAT, ce mécanisme ne constitue pas une spécificité de NiV et est présent chez d'autres paramyxovirus.

W constitue une spécificité de NiV et HeV parmi les paramyxovirus : son CTD spécifique est relativement long (43 acides aminés) et elle est décrite pour avoir des effets fonctionnels. A contrario, l'addition de deux G aux sites d'édition des gènes P de MeV, PPRV, RPV et SeV entraîne la production de protéines avec des CTD spécifiques de 16, 11, 3 et 1 acide(s) aminé(s) respectivement, sans fonction décrite. A noter cependant que NDV produit une protéine W avec un CTD spécifique de 45 acides aminés, mais qui n'a pas de fonction connue à l'heure actuelle. Bien que la protéine W de NiV inhibe la production d'interféron et la production de chimiokines *in vitro*, aucun mécanisme n'avait été jusque-là proposé pour expliquer ces effets. L'inhibition de la voie NF-κB par W dépendante de sa localisation nucléaire est une piste intéressante pour détailler comment la W module la réponse inflammatoire *in vivo* et qui s'intègre dans ce qui est actuellement établi. De plus, la nécessité de la localisation nucléaire de W pour ses effets fonctionnels avait déjà été soulignée (Shaw et al. 2005) et pourrait revêtir une importance majeure dans le rôle de cette protéine *in vivo*. En effet, la localisation nucléaire de W ne dépend pas d'un seul NLS mais d'une combinaison de plusieurs signaux d'import et d'export nécessitant l'intervention de plusieurs partenaires cellulaires : importines α1, α3, α4 et exportine 1 (Audsley et al. 2016). L'implication de ces différents partenaires pose la question de la localisation nucléaire de W en fonction de leurs niveaux d'expression respectifs dans différents types cellulaires. Les premières études définissaient W comme une protéine nucléaire, mais en fonction des types cellulaires la proportion noyau/cytoplasme de W varie. En outre, dans les cellules endothéliales HULEC, LYMEC et HUVEC, W serait uniquement cytoplasmique (Lo et al. 2010). Ces différences de localisation dans les différents types cellulaires pourraient avoir une implication sur les effets fonctionnels de W selon le type cellulaire et refléter un usage variable des NES et NLS aboutissant à une combinaison fonctionnelle variable.

Compte tenu de ces éléments, nous pouvons proposer le modèle suivant comme explication possible du rôle de W lors de l'infection chez l'Homme et comme hypothèse pour les travaux à venir :

- NiV pénètre par les voies respiratoires et infecte les cellules épithéliales (Borisevich et al. 2017), où V et W inhibent les défenses antivirales.
- NiV infecte également les cellules endothéliales, où W (parce que cytoplasmique) n'inhiberait pas la production de chimiokines (incapable d'inhiber la voie NF-κB), ce qui permettrait l'attraction des leucocytes sur le site d'infection (Lo et al. 2010 ; Satterfield et al. 2015).
- Grâce à son affinité pour les héparanes sulfates présents à la surface des lymphocytes (Mathieu et al. 2015), NiV diffuserait rapidement à travers l'organisme (NiV est détecté dans le cerveau de hamsters dès le 1er jour d'infection après infection intrapéritonéale).

La W serait ainsi impliquée dans la diffusion de NiV à travers l'organisme grâce à une inhibition de la voie NF-κB dépendante du type cellulaire. Les futures expérimentations devront

s'intéresser à définir précisément le site d'interaction entre W et son partenaire impliqué dans la modulation de la voie NF-κB. Cela devrait permettre de définir une mutation permettant de perdre cette interaction, qui insérée dans un virus recombinant devrait permettre de valider ou non ce modèle *in vivo*.

Comme vu précédemment, les effets fonctionnels de la V actuellement décrits ne permettent pas de proposer un modèle expliquant les différences de pouvoir pathogène observées *in vivo* entre NiV WT et NiV V ko. Il faut envisager que le rôle de V dans le pouvoir pathogène soit dû à un effet fonctionnel à ce jour encore non défini et/ou lié aux effets des autres protéines du virus ou encore à une somme de plusieurs effets (par exemple sur les HSP, protéines ribosomales, etc…). Il faut également envisager que les modèles animaux actuellement utilisés (furet, hamster, …) ne soient pas les plus pertinents pour comprendre le rôle des PNS dans la pathogénie de NiV chez les espèces naturellement infectées : des études plus approfondies devraient être réalisées chez le porc et le cheval.

Enfin, il faut garder à l'esprit que les hôtes naturels de NiV sont des chauves-souris de la famille des *Pteropodidae*. Les chauves-souris sont les hôtes naturels de nombreux virus (Hoffmann et al. 2013 ; Luis et al. 2013). Plusieurs senseurs de ces virus, ainsi que certains gènes activés par ces senseurs, ont été décrits comme étant sous sélection positive chez les chauves-souris (par exemple RIG-I, les TLRs 3, 7, 8 et 9, et certains ISGs (Zhang et al. 2013 ; Jiang et al. 2017)), suggérant une adaptation des chauves-souris à ces virus. De façon intéressante, plusieurs études rapportent également des caractéristiques de la voie NF-κB spécifiques aux chauves-souris (G. Zhang et al. 2013 ; Banerjee et al. 2017). En outre, les chauves-souris se sont adaptées au vol et ont ainsi acquis des caractères spécifiques, comme la gestion du stress oxydatif en lien avec l'augmentation de leur métabolisme. La réponse immunitaire induisant aussi une élévation du stress oxydatif (Brunet-Rossinni 2004 ; Schneeberger et al. 2013), une meilleure gestion de ce stress chez les chauves-souris est également une hypothèse avancée pour expliquer leur maîtrise des infections virales. De plus, l'immunité innée et les mécanismes de réparation de l'ADN étant intriqués (via la voie NF-κB par exemple), l'adaptation au vol et la gestion du stress oxydatif a pu influencer leur réponse immunitaire (Bean et al. 2013). L'ensemble de ces éléments met en lumière les différents aspects de l'immunité, qui diffèrent chez les chauves-souris par rapport à ceux des autres mammifères. Ces éléments pourraient ainsi expliquer que chez certains hôtes accidentels dont l'arsenal antiviral est différent de celui des chauves-souris et non adapté aux virus qu'elles hébergent, une forte pathogénicité est observée lors de l'infection par NiV (Bean et al. 2013). Ainsi, l'exploration des relations hôte/virus dans ces espèces apparait particulièrement pertinente. Les outils cellulaires développés au cours de nos travaux devraient nous permettre de comparer les interactions entre NiV et son hôte naturel et celles entre NiV et ses hôtes accidentels (chez qui, il est pathogène). Cette comparaison devrait nous permettre à terme de mieux définir les éléments présents ou absents, chez l'Homme ou chez la chauve-souris, responsables de son pouvoir pathogène. Une autre piste intéressante est l'hébergement par ces chauves-souris de CeV ne produisant pas de protéines V et W, et ayant

un capacité limitée à lier les protéines STAT (Marsh et al. 2012 ; Lieu et al. 2015). L'existence de ce virus semble suggérer que V et W ne sont pas nécessaires au maintien des Henipavirus au sein de leurs hôtes réservoirs. Une comparaison des interactions hôte/pathogènes entre NiV et CeV pourrait également permettre de déterminer les partenaires absents ou présents lors de l'infection par un virus par rapport à l'autre, et ainsi déterminer les mécanismes mis en jeu lors de l'infection par NiV permettant aux chauves-souris de bloquer le pouvoir pathogène lié à V et W.

ANNEXES

ANNEXE 1 : EXPLORATION DES PARTENARIATS CELLULAIRES DES PROTEINES V ET W DE NIV

A. Introduction

Le but de cette partie est d'obtenir des données préliminaires d'interaction des protéines V et W de NiV avec les protéines cellulaires humaines. Pour ce faire, des partenaires cellulaires de ces protéines ont été mis en évidence à l'aide d'un criblage par spectrométrie de masse (réalisé une seule fois).

Notre principale hypothèse formulée pour expliquer l'inhibition de la production des chimiokines par les NSP de NiV est une perturbation de la voie NF-κB par ces mêmes protéines. Ainsi, la possible implication des différentes interactions mises en évidence dans une modulation de la voie NF-κB sera discutée. En outre, cet interactome devrait permettre de formuler de nouvelles hypothèses de recherche quant à l'implication des PNS de NiV dans des mécanismes, non décrits à ce jour, de détournement de la machinerie cellulaire par NiV.

B. Matériel et méthodes

1. Généralités

Les conditions de culture des cellules HeLa, ainsi que les techniques de construction de plasmides, de co-immunoprécipitation, de western-blot et d'immunofluorescence ont été détaillées dans le « Matériel et Méthodes » de la partie « I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W ».

L'anticorps de lapin anti-PR65A (NBP2-19907, Novusbio) a été utilisé pour détecter les protéines endogènes.

2. Analyse des co-immunoprécipitations par spectrométrie de masse

Les échantillons issus des co-immunoprécipitations ont été déposés sur un gel polyacrylamide de concentration pour concentrer les protéines par électrophorèse. Les bandes correspondantes ont été découpées pour analyse par spectrométrie de masse. Les protéines des bandes du gel de concentration ont été digérées par ajout de trypsine et analysées par nano-chromatographie liquide (LC)-MS/MS. La séparation des peptides a été réalisée avec préconcentration sur une pré-colonne C18 (Acclaim™ PepMap™ 5 µm; 100 Å; 300 µm x 5 mm; Thermo Fisher Scientific) puis élution sur une nano colonne C18 (Accucore™ 2.6 µm; 150 Å; 75 µm x 500 mm; Thermo Fisher Scientific) avec un gradient linéaire d'acétonitrile/acide formique de 5%/0,1% à 50%/0,1%, à un débit de 200 nl/min pendant 120 min. Les données ont été acquises avec le logiciel Xcalibur™ (v2.2 Thermo Fisher Scientific) sur un spectromètre de masse LTQ Velos (Dual Pressure Linear Ion Trap ; Thermo Fisher Scientific) en mode positif par cycle d'un scan MS sur la gamme de masse m/z 400-1600 en

mode « Resolution Enhanced », suivi de scans MS/MS en mode « Resolution Normal » sur les 20 ions MS les plus intenses, en mode CID et de charge de 2 ou plus, et avec une énergie de collision de 35eV.

Les protéines ont été identifiées avec l'algorithme MASCOT (v2.4 Matrix Science) à l'aide du logiciel Proteome Discoverer™ (v1.4 Thermo Fisher Scientific) et interrogation de la base de données UniProtKB/Swiss-Prot humaines (téléchargées en Septembre 2016, 72 285 entrées) en utilisant une tolérance sur la mesure de masse de 0,8 Da en mode MS et 0,5 Da pour les ions MS/MS. Les résultats ont été validés avec Mascot Percolator basé sur la valeur de confiance q inférieur à 0,01 et un taux de faux positif de 1%. Dans chaque liste de protéines obtenues pour les conditions V et W, ont été retirées les protéines détectées dans la condition transfectée avec le vecteur vide.

C. Résultats

L'ensemble des interactions a été obtenu dans des cellules HeLa en contexte de transfection. Les cellules transfectées avec des plasmides codant pour les protéines V ou W étiquetées Flag ont été lysées. Les co-immunoprécipitations ont été réalisées en utilisant des billes magnétiques couplées avec des anticorps anti-Flag. Les protéines présentes dans les éluats des billes ont été concentrées par SDS-PAGE avant l'analyse par spectrométrie de masse.

1. Protéines co-immunoprécipitant à la fois avec V et W

49 candidats interactants de la protéine V et 12 de la protéine W ont été identifiés, ce qui a permis de déterminer la liste des interactants communs aux deux protéines (**Tableau 1**). Plusieurs HSPs et la protéine STAT1 font partie de cette liste d'interactants communs aux deux protéines.

Tableau 1 : *Liste des protéines co-immunoprécipitant à la fois avec V et W dans les cellules HeLa (c'est-à-dire les protéines en commun aux deux listes des protéines co-immunoprécipitant avec V et W). Le nom du gène codant pour chaque protéine est indiqué entre parenthèse. Les différentes isoformes des protéines détectées n'ont pas été précisées.*

N° d'accession	Protéines
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8)
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B (HSPA1A)
P11021	78 kDa glucose-regulated protein (HSPA5)
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial (HSPA9)
P42224	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta (STAT1)
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
P62829	60S ribosomal protein L23 (RPL23)
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19 (PRPF19)

2. Protéines ne co-immunoprécipitant qu'avec W

Un deuxième tri (par soustraction des protéines du tableau 1) a permis d'établir la liste des candidats interactants de W n'interagissant pas avec V (**Tableau 2**). Quatre protéines appartiennent à la liste des candidats : CDC5L (Cell Division Cycle 5-Like protein), importine α4, PR65A (Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha) et la protéine 14-3-3 Theta.

Tableau 2 : *Liste des protéines co-immunoprécipitant uniquement avec W dans les cellules HeLa (les protéines en commun avec la liste des protéines co-immunoprécipitant avec V ont été soustraites). Le nom du gène codant pour chaque protéine est indiqué entre parenthèse. Les différentes isoformes des protéines détectées n'ont pas été précisées.*

N° d'accession	Protéines
Q99459	Cell division cycle 5-like protein (CDC5L)
O00505	Importin subunit alpha-4 (KPNA3)
P27348	14-3-3 protein theta (YWHAQ)
P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform (PPP2R1A)

3. Protéines ne co-immunoprécipitant qu'avec V

Les candidats interactants de V ne co-immunoprécipitant pas avec W font l'objet de 2 tableaux distincts. Du fait de leur grand nombre (18 protéines sur 49 interactants), le **Tableau 4** regroupe l'ensemble des protéines ribosomales 40S et 60S qui co-immunoprécipitent avec la protéine V. Les autres candidats interactants de V sont regroupés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : *Liste des protéines co-immunoprécipitant avec V, mais pas avec W, dans les cellules HeLa (les protéines en commun avec la liste des protéines co-immunoprécipitant avec W ont été soustraites), hormis les protéines 40S et 60S ribosomales qui font l'objet du tableau 4. Le nom du gène codant pour chaque protéine est indiqué entre parenthèse. Les différentes isoformes des protéines détectées n'ont pas été précisées.*

N° d'accession	Protéines
P68363	Tubulin alpha-1B chain (TUBA1B)
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6 (HSPA6)
P68366	Tubulin alpha-4A chain (TUBA4A)
P05141	ADP/ATP translocase 2 (SLC25A5)
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial (SSBP1)
P12236	ADP/ATP translocase 3 (SLC25A6)
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1 (PCBP1)
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2)
P57721	Poly(rC)-binding protein 3 (PCBP3)
P68104	Elongation factor 1-alpha 1 (EEF1A1)
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3 (EEF1A1P5)
Q9UJS0	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 (SLC25A13)
P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 (FXR1)
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1)
Q06787	Fragile X mental retardation protein 1 (FMR1)
P31327	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial (CPS1)
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3 (SF3B3)
P06748	Nucleophosmin (NPM1)
Q8IXB1	DnaJ homolog subfamily C member 10 (DNAJC10)
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (SDHA)
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain (SLC3A2)
Q06830	Peroxiredoxin-1 (PRDX1)
A6NMY6	Putative annexin A2-like protein (ANXA2P2)

Tableau 4 : *Liste des protéines 40S et 60S ribosomales co-immunoprécipitant avec V dans les cellules HeLa. Le nom du gène codant pour chaque protéine est indiqué entre parenthèse. Les différentes isoformes des protéines détectées n'ont pas été précisées.*

N° d'accession	Protéines
P62701	40S ribosomal protein S4, X (RPS4X)
P27635	60S ribosomal protein L10 (RPL10)
P23396	40S ribosomal protein S3 (RPS3)
P62829	60S ribosomal protein L23 (RPL23)
P62753	40S ribosomal protein S6 (RPS6)
P62913	60S ribosomal protein L11 (RPL11)
P15880	40S ribosomal protein S2 (RPS2)
P61247	40S ribosomal protein S3a (RPS3A)
P62280	40S ribosomal protein S11 (RPS11)
P62854	40S ribosomal protein S26 (RPS26)
P18621	60S ribosomal protein L17 (RPL17)
P83731	60S ribosomal protein L24 (RPL24)
P46777	60S ribosomal protein L5 (RPL5)
P62266	40S ribosomal protein S23 (RPS23)
P26373	60S ribosomal protein L13 (RPL13)
P62263	40S ribosomal protein S14 (RPS14)
P46781	40S ribosomal protein S9 (RPS9)
Q02543	60S ribosomal protein L18a (RPL18A)

4. Confirmation des co-immunoprécipitations par révélation en WB

Les co-immunoprécipitations détéctées par spectrométrie de masse entre V et STAT1, HSP90 et HSP70 ont été confirmées par western-blot dans « III. RESULTATS COMPLEMENTAIRES SUR L'INHIBITION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV V » de la partie RESULTATS. La co-immunoprécipitation détéctée par spectrométrie de masse entre W et les protéines 14-3-3 a été confirmée par western-blot dans « I. MODULATION DE LA VOIE CANONIQUE DE NF-κB PAR NiV W » de la partie RESULTATS.

Des plasmides codant pour la mCherry (pour contrôle), pour les protéines V et W de NiV, et leurs troncatures étiquetées Flag ont été transfectés dans des cellules HeLa. Lors de co-immunoprécipitations révélées par western-blot utilisant un anticorps spécifique, PR65A (= PPP2R1A) co-immunoprécipite avec l'ensemble des protéines exprimées (**Figure 1**). Cependant, la quantité de protéines PR65A co-immunoprécipitées semble plus importante en présence de W et de son CTD spécifique.

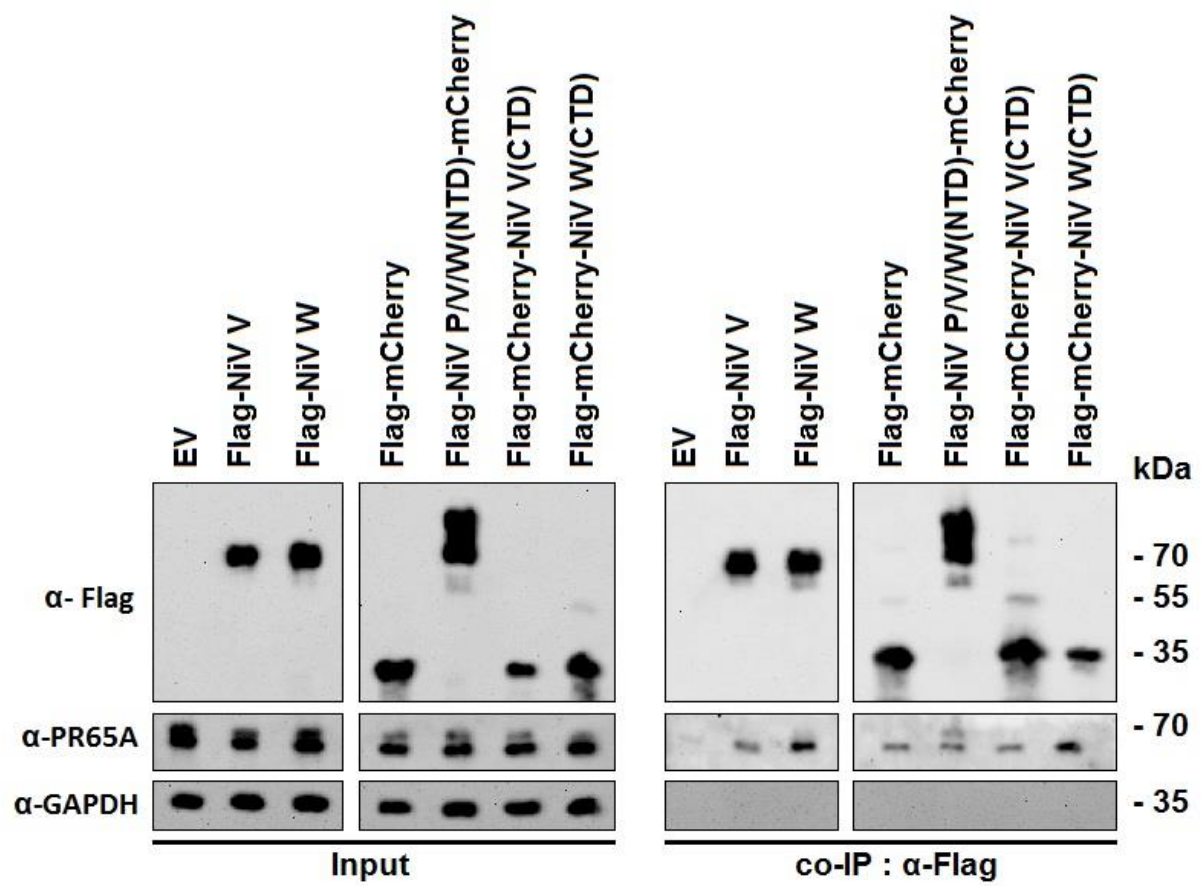


Figure 1 : *Co-immunoprécipitation des protéines V et W de NiV avec PR65A. Des plasmides codant pour les protéines V et W de NIV, ainsi que pour leurs troncatures étiquetées Flag ont été transfectés dans des cellules HeLa. Un vecteur vide (EV) a été utilisé comme contrôle. Après co-immunoprécipitation grâce à des billes magnétiques couplées avec des anticorps anti-Flag, les protéines étiquetées Flag ont été détectées par western-blot avec un anticorps anti-Flag et la protéine PR65A avec un anticorps spécifique. La colonne de gauche montre les protéines présentes dans le lysat cellulaire. La colonne de droite montre les protéines présentes après co-immunoprécipitation.*

La protéine V de NiV semble interagir avec de nombreuses HSP, comme d'autres protéines virales, y compris la V de MeV (Komarova et al. 2011). La co-immunoprécipitation de V avec HSP70 a été confirmée par western-blot et afin de déterminer si une séquence particulière d'acides aminés de P et V co-immunoprécipite avec cette protéine, des plasmides codant pour les protéines de NiV et leurs troncatures étiquetées Flag ont été transfectés dans des cellules HeLa. HSP70 co-immunoprécipite avec NiV P, V et MeV V (**Figure 4A**). Dans les mêmes conditions, le domaine correspondant au NTD commun à V et P co-immunoprécipite avec HSP70, contrairement aux CTD spécifiques de P et V (**Figure 4A**). Puisque toutes les troncatures du NTD co-immunoprécipitent avec HSP70, la co-immunoprécipitation de V avec HSP70 ne semble pas être spécifique d'une séquence particulière (**Figure 4B**).

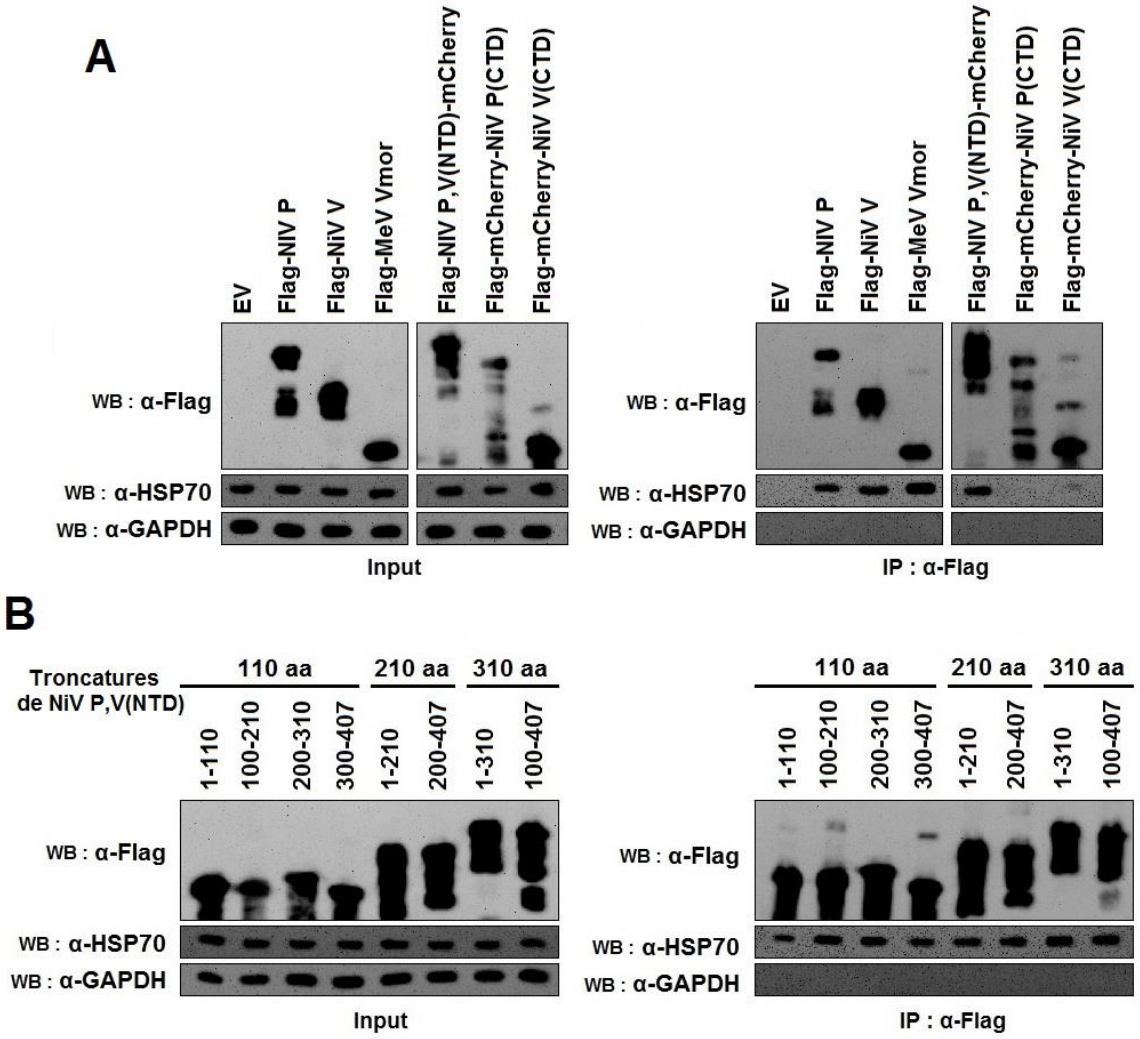


Figure 2 : *Détails sur la co-immunoprécipitation de la protéine V avec HSP70.* ***A :*** *des plasmides codant pour les protéines P, V de NIV et V de MV, ainsi que pour les NTD et CTD de P et V étiquetés Flag ont été transfectés dans des cellules HeLa. Un vecteur vide (EV) a été utilisé comme contrôle. Après co-immunoprécipitation grâce à des billes magnétiques couplées avec des anticorps anti-Flag, les protéines étiquetées Flag ont été détectées par western-blot avec un anticorps anti-Flag et la protéine HSP70 avec un anticorps spécifique. La colonne de gauche montre les protéines présentes dans le lysat cellulaire. La colonne de droite montre les protéines présentes après co-immunoprécipitation.* ***B :*** *même méthode utilisée pour explorer l'interaction de HSP70 avec les différentes troncatures du NTD de V.*

Afin de déterminer si une interaction de V et HSP70 pourrait avoir une implication dans la cellule, des cellules HeLa transfectées soit avec un plasmide codant pour la protéine V soit avec un vecteur vide (utilisé comme contrôle) ont été marquées pour observation de la protéine HSP70 et de la protéine V par immunofluorescence en microscopie confocale. Dans les conditions transfectées avec le vecteur vide, HSP70 se distribue uniformément dans la cellule (dans le cytoplasme et dans le noyau) (**Figure 3** condition **EV**). La protéine V est quasi exclusivement présente dans le cytoplasme et forme des amas aux extrémités de la cellule (**Figure 3** condition **V**). En présence de V, la protéine HSP70 est localisée en grande partie dans le cytoplasme et semble co-localiser avec la protéine V notamment au niveau des amas de V (**Figure 3** condition **V**).

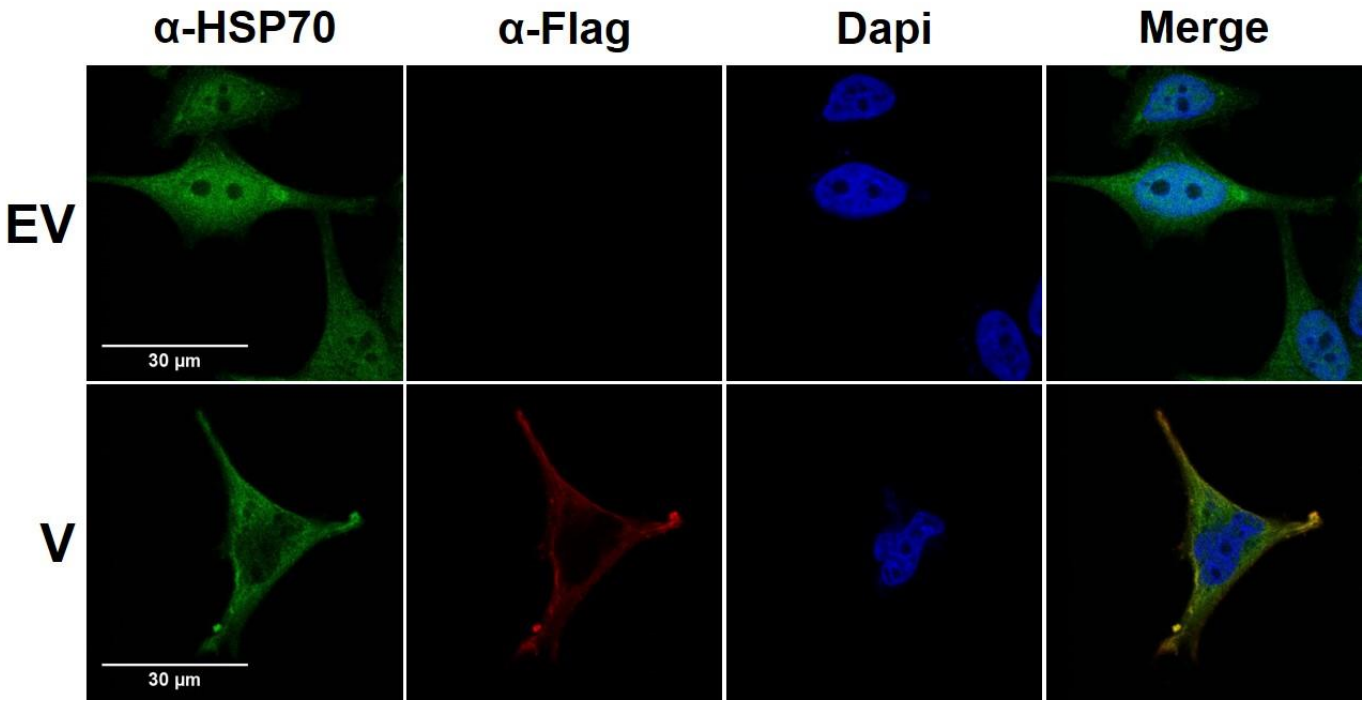


Figure 3 : *La protéine V séquestre HSP70 dans le cytoplasme. Un plasmide codant pour la protéine V ou un vecteur vide ont été transfectés dans des cellules HeLa. 20h après transfection, les cellules ont été fixées et perméabilisées. Les protéines ont été marquées avec un anticorps de souris anti-Flag et un anticorps de lapin spécifique anti-HSP70. Elles ont ensuite été marquées avec des anticorps anti-souris et anti-lapin Alexa 555 et Alexa 488 respectivement. Les noyaux ont été marqués avec du Dapi. Les images présentées sont représentatives des photos obtenues pour chaque condition. La barre en bas à gauche indique l'échelle.*

D. Conclusion de l'Annexe 1

Dans nos conditions, peu de candidats interactants ont été détectés pour V et surtout pour W. En effet, dans un interactome réalisé avec la protéine V de MeV, le nombre de protéines interagissant avec V en contexte d'infection (n = 245) est bien supérieur au nombre de candidats interactants en contexte de transfection (n = 142) (Komarova et al. 2011). Cependant, le total de 142 candidats interactants pour la protéine V de MeV en contexte de transfection, par rapport aux 49 candidats interactants de NIV V rapportés ici, suggère que nos conditions expérimentales pourraient être moins sensibles. Pour W, outre le fait que la protéine pourrait avoir moins de partenaires protéiques du fait de sa localisation nucléaire, une faible perméabilisation du noyau avec le tampon de lyse utilisé pourrait également expliquer le faible nombre de candidats interactants identifiés.

L'observation de partenaires putatifs communs à V et W est attendue à cause de leur NTD en commum (**Tableau 1**). Cependant, le nombre de ces candidats interactants en commun est relativement faible (n = 8), si l'on considère la longueur de leur NTD commun (407 acides aminés) par rapport à leur CTD spécifique (49 acides aminés pour V et 43 acides aminés pour W). Ce faible nombre pourrait être lié au fait que peu de protéines co-immunoprécipitant avec W ont été détectées (n = 12) et pourrait aussi être lié à la différence

de localisation cellulaire des deux protéines. La protéine STAT1 fait partie des candidats interactants communs à V et W (résultat confirmé par western-blot), en accord avec le site d'interaction avec STAT1 précédemment identifié dans le NTD commun aux protéines P, V et W (Rodriguez et al. 2002 ; Rodriguez et al. 2004 ; Ciancanelli et al. 2009).

Plusieurs HSP co-immunoprécipitent à la fois avec V et W (n = 4), alors que d'autres ne co-immunoprécipitent qu'avec V, notamment HSP90 (résultat confirmé par western-blot) (**Tableau 3**). Il a déjà été démontré que plusieurs HSP co-immunoprécipitent également avec la V de MeV (Komarova et al. 2011). P et V de NiV interagissent avec HSP70 via leur NTD en commun (**Figure 2A**). Cette interaction de V avec HSP70 ne semble pas spécifique d'une séquence particulière du NTD (**Figure 2B**). Le NTD commun de NiV P et V, comme celui de MeV V, est une longue chaîne désordonnée de 407 acides aminés (Longhi et al. 2017 ; Chan et al. 2004). Ce caractère désordonné pourrait expliquer l'affinité non spécifique de séquence que les HSP présentent pour ces protéines (**Figure 2B**). En effet, les fonctions de chaperone des HSP sont activées dans des conditions de stress, qui provoquent le dépliement des protéines. Elles présentent ainsi une forte affinité pour des séquences d'acides aminés non repliés sans spécificité particulière (Groitl et al. 2016). De nombreuses HSP sont souvent détectées lors des tests d'interaction par spectrométrie de masse (comme c'est le cas pour 14-3-3 θ par exemple, Schuster et al. 2011), y compris avec des protéines virales. Ces interactions peuvent être directes ou indirectes via leurs multiples partenaires cellulaires. De façon intéressante, certaines HSP sont des facteurs indispensables à la bonne réplication des virus, comme c'est le cas de HSP90 pour les paramyxovirus (Bloyet et al. 2016). Les HSP sont essentielles à de nombreux processus cellulaires, notamment dans la signalisation de la voie NF-κB (Chen et al. 2002 ; Salminen et al. 2008). Particulièrement, HSP70 interagit avec TRAF2 (Dai et al. 2010) et TRAF6 (Chen et al. 2006) pour inhiber la voie NF-κB.

Alors que HSP70 est normalement uniformément répartie dans la cellule (dans le noyau et le cytoplasme) (**Figure 3** condition **EV**), l'expression de la protéine V de NiV dans la cellule entraîne une localisation quasi exclusivement cytoplasmique d'HSP70 (**Figure 3** condition **V**). Le fait que V séquestre HSP70 dans le cytoplasme pourrait avoir une implication sur la voie NF-κB. Des tests supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer que HSP70 est bien impliquée dans l'effet inhibiteur de V et que cet effet est également présent en contexte d'infection. Mais du fait de l'implication importante de cette protéine dans les processus cellulaires et viraux, ainsi que l'absence de séquence spécifique de V pour l'interaction, cette investigation pourrait s'avérer difficile.

La protéine V co-immunoprécipite également avec un grand nombre (n = 18) de protéines ribosomales 40S et 60S (**Tableau 4**). De nombreuses co-immunoprécipitations avec des protéines ribosomales ont déjà été mises en évidence avec la protéine V de MeV (Komarova et al. 2011), suggérant que les protéines V de ces paramyxovirus pourraient être impliquées dans des mécanismes d'optimisation de la traduction des ARN viraux ou au contraire dans des mécanismes de limitation de la synthèse de facteurs de restriction

cellulaires. Plusieurs interactions précédemment décrites n'ont pas été détectées. Ainsi, alors que V et W de NiV interagissent avec STAT1, l'interaction de V avec STAT2 n'a pas été détectée (mise en évidence en cellules HEK293T (Rodriguez et al. 2002). Les interactions de V avec MDA5 (mise en évidence en cellules HEK293 (Childs et al. 2007)), LGP2 (mise en évidence en cellules HEK293T (Parisien et al. 2009)) et PLK1 (mise en évidence en cellules HEK293T (Ludlow et al. 2008)), détectées par co-immunoprécipitation, n'ont pas non plus été observées.

Dans nos conditions expérimentales, la protéine W interagirait avec l'importine α4 (**Tableau 2**), en accord avec sa localisation majoritairement nucléaire (Shaw et al. 2005), alors que ni l'exportine 1 ni l'importine α1 ni l'importine α3 n'ont co-immunoprécipitées en désaccord avec des observations faites en cellules 2fTGH et HEK293T (Rodriguez et al. 2004 ; Shaw et al. 2005 ; Audsley et al. 2016). Cependant, le NES de W a été démontré fonctionnel dans nos cellules HeLa, tout comme le second signal d'import situé dans son CTD et décrit pour interagir avec l'importine α1 (voir « III. DETAILS DU MECANISME D'IMPORT ET D'EXPORT DE LA PROTEINE W » dans la partie RESULTATS), suggérant que l'ensemble des partenaires cellulaires de W n'a pas été récupéré. De façon intéressante, W interagirait avec trois protéines, CDC5L (**Tableau 2**), Pre-mRNA-processing factor 19 (PRPF19) (**Tableau 1**) et PR65A (= PP2R1A, résultat confirmé par western-blot) (**Tableau 2**), impliquées dans le complexe du spliceosome (Shi et al. 2006 ; Grote et al. 2010). Elle interagirait aussi avec une protéine de la famille des protéines 14-3-3 (résultat confirmé par western-blot), qui sont elles aussi impliquées dans la formation du spliceosome (Urano-Tashiro et al. 2010). Ces données suggèrent que W de NiV pourrait être impliquée dans des mécanismes d'épissage des ARNm.

En outre, les protéines 14-3-3 sont impliquées dans le rétrocontrôle négatif de la voie NF-κB (Aguilera et al. 2016). En effet, après stimulation de la voie avec TNFα, les protéines 14-3-3 interagissent avec p65 et IκBα dans le noyau pour faciliter leur export nucléaire permettant ainsi un retour de la voie au niveau basal. En outre, 14-3-3 Theta est impliqué dans la régulation de la signalisation via les TLRs et régulerait la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNFα (Schuster et al. 2011). Les protéines 14-3-3 reconnaissent chez leurs partenaires des séquences consensus RxxpS/TxP, RxxxpS/TxP ou encore RxxpS/TxR (où R est un résidu arginine, pS/T un résidu sérine ou tréonine phosphorylé et P un résidu proline), mais également de nombreuses séquences alternatives (Yaffe 2002 ; Johnson et al. 2010 ; Chan et al. 2011). Compte-tenu de sa richesse en résidus S et T, de nombreux sites de la protéine W sont candidats pour porter cette interaction. Une interaction de W avec la protéine 14-3-3 Theta est une hypothèse intéressante pour un possible effet modulateur sur la voie NF-κB et serait cohérente avec notre hypothèse initiale d'un effet de W sur la voie NF-κB. Il a été suggéré que les protéines 14-3-3 pouvaient interférer avec les séquences d'import et d'export d'un certain nombre de protéines régulatrices des voies de signalisation afin de moduler leurs activités (Muslin et Xing 2000). W comporte plusieurs sites d'import et d'export nucléaires (voir « III. DETAILS DU MECANISME D'IMPORT ET D'EXPORT DE LA PROTEINE W » de la partie RESULTATS). Le masquage de ces séquences d'import et d'export nucléaires de W par les protéines 14-3-3 pour moduler sa distribution cellulaire est une autre hypothèse à prendre en compte.

L'ensemble de ces données nourrit plusieurs hypothèses pour l'exploration des mécanismes de modulation de la voie NF-κB par les protéines V et W (HSP, 14-3-3, etc…). Elles ouvrent également des pistes pour de nouveaux mécanismes de détournement de la machinerie cellulaire par NiV, notamment concernant l'épissage et la traduction des ARN. Cependant, ces interactions devront être confirmées et ne sont pas exhaustives. De plus, les conditions d'expérimentations, le type de cellule et le contexte cellulaire (contexte d'infection, de transfection, moment du cycle cellulaire, etc…) influent sur les interactions protéiques. Les niveaux d'expression cellulaires (qui sont fonction des différents types de cellules) des différents partenaires protéiques de NiV influent sur les résultats des interactomes. Ainsi, en fonction de ces différentes conditions, des partenaires précédemment identifiés peuvent ne pas être détectés, alors que de nouveaux le seront. D'autres criblages des interactions des protéines de NiV seront nécessaires dans d'autres systèmes cellulaires pour aborder la complexité des interactions moléculaires de ce virus avec son hôte.

ANNEXE 2 : HSP90 CHAPERONING IN ADDITION TO PHOSPHOPROTEIN REQUIRED FOR FOLDING BUT NOT FOR SUPPORTING ENZYMATIC ACTIVITIES OF MEASLES AND NIPAH VIRUS L POLYMERASES

Bloyet, Louis-Marie, Jérémy Welsch, François Enchery, Cyrille Mathieu, Sylvain de Breyne, Branka Horvat, Boyan Grigorov, et Denis Gerlier. 2016. « HSP90 Chaperoning in Addition to Phosphoprotein Required for Folding but Not for Supporting Enzymatic Activities of Measles and Nipah Virus L Polymerases ». *Journal of Virology* 90 (15):6642-56. https://doi.org/10.1128/JVI.00602-16.

ANNEXE 3 : UNDERSTANDING THE INTERACTIONS BETWEEN HENIPAVIRUSES AND THEIR NATURAL HOST, FRUIT BTAS: PAVING THE WAY TOWARD CONTROL OF HIGHLY LETHAL INFECTION IN HUMAN

Enchéry, François, et Branka Horvat. 2017. « Understanding the Interaction between Henipaviruses and Their Natural Host, Fruit Bats: Paving the Way toward Control of Highly Lethal Infection in Humans ». *International Reviews of Immunology* 36 (2):108-21. https://doi.org/10.1080/08830185.2016.1255883.

ANNEXE 4 : RECENT CHALLENGES IN UNDERSTANDING HENIPAVIRUS IMMUNOPATHOGENESIS: ROLE OF VIRAL NONSTRUCTURAL PROTEINS

Enchéry, François, et Branka Horvat. 2014. « Recent Challenges in Understanding Henipavirus Immunopathogenesis: Role of Viral Nonstructural Proteins ». *Future Virology* (2014)9(6), 00-00.

REFERENCES

Aguilar, Hector C., Vanessa Aspericueta, Lindsey R. Robinson, Karen E. Aanensen, et Benhur Lee. 2010. « A Quantitative and Kinetic Fusion Protein-Triggering Assay Can Discern Distinct Steps in the Nipah Virus Membrane Fusion Cascade ». *Journal of Virology* 84 (16):8033-41. https://doi.org/10.1128/JVI.00469-10.

Aguilera, Cristina, Vanessa Fernández-Majada, Julia Inglés-Esteve, Verónica Rodilla, Anna Bigas, et Lluís Espinosa. 2016. « Efficient Nuclear Export of p65-IκBα Complexes Requires 14-3-3 Proteins ». *Journal of Cell Science* 129 (12):2472. https://doi.org/10.1242/jcs.192641.

Algarté, M., H. Nguyen, C. Heylbroeck, R. Lin, et J. Hiscott. 1999. « IkappaB-Mediated Inhibition of Virus-Induced Beta Interferon Transcription ». *Journal of Virology* 73 (4):2694-2702.

Anti, Priscilla, Michael Owusu, Olivia Agbenyega, Augustina Annan, Ebenezer Kofi Badu, Evans Ewald Nkrumah, Marco Tschapka, Samuel Oppong, Yaw Adu-Sarkodie, et Christian Drosten. 2015. « Human–Bat Interactions in Rural West Africa ». *Emerging Infectious Diseases* 21 (8):1418. https://doi.org/10.3201/eid2108.142015.

Araujo, Jansen de, Michael K. Lo, Azaibi Tamin, Tatiana L. Ometto, Luciano M. Thomazelli, Marcello S. Nardi, Renata F. Hurtado, et al. 2017. « Antibodies Against Henipa-Like Viruses in Brazilian Bats ». *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 17 (4):271-74. https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2051.

Audsley, Michelle D., David A. Jans, et Gregory W. Moseley. 2016. « Nucleocytoplasmic Trafficking of Nipah Virus W Protein Involves Multiple Discrete Interactions with the Nuclear Import and Export Machinery ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479 (3):429-33. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.043.

Baltimore, David. 2011. « NF-κB Is 25 ». *Nature Immunology* 12 (8):683-85. https://doi.org/10.1038/ni.2072.

Banerjee, Arinjay, Noreen Rapin, Trent Bollinger, et Vikram Misra. 2017. « Lack of Inflammatory Gene Expression in Bats: A Unique Role for a Transcription Repressor ». *Scientific Reports* 7 (1):2232. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01513-w.

Baseler, Laura, Dana P. Scott, Greg Saturday, Eva Horne, Rebecca Rosenke, Tina Thomas, Kimberly Meade-White, Elaine Haddock, Heinz Feldmann, et Emmie de Wit. 2016. « Identifying Early Target Cells of Nipah Virus Infection in Syrian Hamsters ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (11). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005120.

Bean, Andrew G. D., Michelle L. Baker, Cameron R. Stewart, Christopher Cowled, Celine Deffrasnes, Lin-Fa Wang, et John W. Lowenthal. 2013. « Studying Immunity to Zoonotic Diseases in the Natural Host — Keeping It Real ». *Nature Reviews Immunology* 13 (12):nri3551. https://doi.org/10.1038/nri3551.

Ben-Addi, Abduelhakem, Agnes Mambole-Dema, Christine Brender, Stephen R. Martin, Julia Janzen, Sven Kjaer, Stephen J. Smerdon, et Steven C. Ley. 2014. « IκB Kinase-Induced Interaction of TPL-2 Kinase with 14-3-3 Is Essential for Toll-like Receptor Activation of ERK-1 and -2 MAP Kinases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (23):E2394-2403. https://doi.org/10.1073/pnas.1320440111.

Ben-Neriah, Yinon. 2002. « Regulatory Functions of Ubiquitination in the Immune System ». *Nature Immunology* 3 (1):20-26. https://doi.org/10.1038/ni0102-20.

Bharaj, Preeti, Yao E. Wang, Brian E. Dawes, Tatyana E. Yun, Arnold Park, Benjamin Yen, Christopher F. Basler, Alexander N. Freiberg, Benhur Lee, et Ricardo Rajsbaum. 2016.

« The Matrix Protein of Nipah Virus Targets the E3-Ubiquitin Ligase TRIM6 to Inhibit the IKKε Kinase-Mediated Type-I IFN Antiviral Response ». *PLoS Pathogens* 12 (9). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005880.

Blocquel, David, Matilde Beltrandi, Jenny Erales, Pascale Barbier, et Sonia Longhi. 2013. « Biochemical and Structural Studies of the Oligomerization Domain of the Nipah Virus Phosphoprotein: Evidence for an Elongated Coiled-Coil Homotrimer ». *Virology* 446 (1-2):162-72. https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.031.

Bloyet, Louis-Marie, Jérémy Welsch, François Enchery, Cyrille Mathieu, Sylvain de Breyne, Branka Horvat, Boyan Grigorov, et Denis Gerlier. 2016. « HSP90 Chaperoning in Addition to Phosphoprotein Required for Folding but Not for Supporting Enzymatic Activities of Measles and Nipah Virus L Polymerases ». *Journal of Virology* 90 (15):6642-56. https://doi.org/10.1128/JVI.00602-16.

Borisevich, Viktoriya, Mehmet Hakan Ozdener, Bilal Malik, et Barry Rockx. 2017. « Hendra and Nipah Virus Infection in Cultured Human Olfactory Epithelial Cells ». *mSphere* 2 (3). https://doi.org/10.1128/mSphere.00252-17.

Bossart, Katharine N., Zhongyu Zhu, Deborah Middleton, Jessica Klippel, Gary Crameri, John Bingham, Jennifer A. McEachern, et al. 2009. « A Neutralizing Human Monoclonal Antibody Protects against Lethal Disease in a New Ferret Model of Acute Nipah Virus Infection ». *PLoS Pathogens* 5 (10). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000642.

Bowden, Thomas A., A. Radu Aricescu, Robert J. C. Gilbert, Jonathan M. Grimes, E. Yvonne Jones, et David I. Stuart. 2008. « Structural Basis of Nipah and Hendra Virus Attachment to Their Cell-Surface Receptor Ephrin-B2 ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (6):567-72. https://doi.org/10.1038/nsmb.1435.

Bradley, J. R., et J. S. Pober. 2001. « Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors (TRAFs) ». *Oncogene* 20 (44):6482-91. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204788.

Brown, Adam J., Bernie Sweeney, David O. Mainwaring, et David C. James. 2015. « NF-κB, CRE and YY1 Elements Are Key Functional Regulators of CMV Promoter-Driven Transient Gene Expression in CHO Cells ». *Biotechnology Journal* 10 (7):1019-28. https://doi.org/10.1002/biot.201400744.

Bruhn, Jessica F., Katherine C. Barnett, Jaclyn Bibby, Jens M. H. Thomas, Ronan M. Keegan, Daniel J. Rigden, Zachary A. Bornholdt, et Erica Ollmann Saphire. 2014. « Crystal Structure of the Nipah Virus Phosphoprotein Tetramerization Domain ». *Journal of Virology* 88 (1):758-62. https://doi.org/10.1128/JVI.02294-13.

Brunet-Rossinni, Anja K. 2004. « Reduced Free-Radical Production and Extreme Longevity in the Little Brown Bat (Myotis Lucifugus) versus Two Non-Flying Mammals ». *Mechanisms of Ageing and Development* 125 (1):11-20.

Bruns, Annie M., et Curt M. Horvath. 2015. « LGP2 Synergy with MDA5 in RLR-Mediated RNA Recognition and Antiviral Signaling ». *Cytokine* 74 (2):198. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.010.

Calisher, Charles H., James E. Childs, Hume E. Field, Kathryn V. Holmes, et Tony Schountz. 2006. « Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses ». *Clinical Microbiology Reviews* 19 (3):531. https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06.

Cevik, Bayram, David E. Holmes, Emmanuel Vrotsos, Joyce A. Feller, Sherin Smallwood, et Sue A. Moyer. 2004. « The phosphoprotein (P) and L binding sites reside in the N-terminus of the L subunit of the measles virus RNA polymerase ». *Virology* 327 (2):297-306. https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.002.

Chadha, Mandeep S., James A. Comer, Luis Lowe, Paul A. Rota, Pierre E. Rollin, William J. Bellini, Thomas G. Ksiazek, et Akhilesh C. Mishra. 2006. « Nipah Virus-associated Encephalitis Outbreak, Siliguri, India ». *Emerging Infectious Diseases* 12 (2):235-40. https://doi.org/10.3201/eid1202.051247.

Chan, Perry M., Yuen-Wai Ng, et Ed Manser. 2011. « A Robust Protocol to Map Binding Sites of the 14-3-3 Interactome: Cdc25C Requires Phosphorylation of Both S216 and S263 to bind 14-3-3 ». *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 10 (3). https://doi.org/10.1074/mcp.M110.005157.

Chan, Y. P., C. L. Koh, S. K. Lam, et L.-F. Wang. 2004. « Mapping of Domains Responsible for Nucleocapsid Protein-Phosphoprotein Interaction of Henipaviruses ». *The Journal of General Virology* 85 (Pt 6):1675-84. https://doi.org/10.1099/vir.0.19752-0.

Chan, Ying Kai, et Michaela U. Gack. 2016. « A phosphomimetic-based mechanism of dengue virus to antagonize innate immunity ». *Nature immunology* 17 (5):523-30. https://doi.org/10.1038/ni.3393.

Chan, Y.-P., M. Lu, S. Dutta, L. Yan, J. Barr, M. Flora, Y.-R. Feng, et al. 2012. « Biochemical, Conformational, and Immunogenic Analysis of Soluble Trimeric Forms of Henipavirus Fusion Glycoproteins ». *Journal of Virology* 86 (21):11457-71. https://doi.org/10.1128/JVI.01318-12.

Chen, Guoqing, Ping Cao, et David V. Goeddel. 2002. « TNF-Induced Recruitment and Activation of the IKK Complex Require Cdc37 and Hsp90 ». *Molecular Cell* 9 (2):401-10.

Chen, Huaqun, Yifan Wu, Yiqing Zhang, Lina Jin, Lan Luo, Bin Xue, Chen Lu, Xiran Zhang, et Zhimin Yin. 2006. « Hsp70 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced NF-kappaB Activation by Interacting with TRAF6 and Inhibiting Its Ubiquitination ». *FEBS Letters* 580 (13):3145-52. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.066.

Chen, Mingzhou, Tomoaki Ogino, et Amiya K. Banerjee. 2006. « Mapping and Functional Role of the Self-Association Domain of Vesicular Stomatitis Virus Phosphoprotein ». *Journal of Virology* 80 (19):9511-18. https://doi.org/10.1128/JVI.01035-06.

Chen, S., H. M. Ma, G. S. Chen, et L. Y. Wang. 2016. « Complete Mitochondrial Genome of the Liuyang Black Goat and Its Phylogenetic Relationship with Other Caprinae ». *Genetics and Molecular Research: GMR* 15 (2). https://doi.org/10.4238/gmr.15028267.

Chen, Zhijian J. 2005. « Ubiquitin Signalling in the NF-kappaB Pathway ». *Nature Cell Biology* 7 (8):758-65. https://doi.org/10.1038/ncb0805-758.

Childs, Kay, Nicola Stock, Craig Ross, Jelena Andrejeva, Louise Hilton, Michael Skinner, Richard Randall, et Stephen Goodbourn. 2007. « mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins ». *Virology* 359 (1):190-200. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.09.023.

Ching, Paola Katrina G., Vikki Carr de los Reyes, Maria Nemia Sucaldito, Enrique Tayag, Alah Baby Columna-Vingno, Fedelino F. Malbas, Gilbert C. Bolo, et al. 2015. « Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines, 2014 ». *Emerging Infectious Diseases* 21 (2):328-31. https://doi.org/10.3201/eid2102.141433.

Chong, H.T., M.J. Hossain, et C.T. Tan. 2008. « Differences in epidemiologic and clinical features of Nipah virus encephalitis between the Malaysian and Bangladesh outbreaks ». *Neurol. Asia*, 23 - 26.

Choudhary, Sanjeev, Steve Boldogh, Roberto Garofalo, Mohammad Jamaluddin, et Allan R. Brasier. 2005. « Respiratory Syncytial Virus Influences NF-kappaB-Dependent Gene Expression through a Novel Pathway Involving MAP3K14/NIK Expression and Nuclear

Complex Formation with NF-kappaB2 ». *Journal of Virology* 79 (14):8948-59. https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.8948-8959.2005.

Chowdhury, Sukanta, Salah Uddin Khan, Gary Crameri, Jonathan H. Epstein, Christopher C. Broder, Ausraful Islam, Alison J. Peel, et al. 2014. « Serological Evidence of Henipavirus Exposure in Cattle, Goats and Pigs in Bangladesh ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (11). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003302.

Chua, K. B., W. J. Bellini, P. A. Rota, B. H. Harcourt, A. Tamin, S. K. Lam, T. G. Ksiazek, et al. 2000. « Nipah Virus: A Recently Emergent Deadly Paramyxovirus ». *Science* 288 (5470):1432-35. https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1432.

Chua, Kaw Bing, Khean Jin Goh, Kum Thong Wong, Adeeba Kamarulzaman, Patrick Seow Koon Tan, Thomas G Ksiazek, Sherif R Zaki, George Paul, Sai Kit Lam, et Chong Tin Tan. 1999. « Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia ». *The Lancet* 354 (9186):1257-59. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04299-3.

Chua, Kaw Bing, Chong Lek Koh, Poh Sim Hooi, Kong Fatt Wee, Jenn Hui Khong, Beng Hooi Chua, Yee Peng Chan, Mou Eng Lim, et Sai Kit Lam. 2002. « Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes ». *Microbes and Infection* 4 (2):145-51. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01522-2.

Ciancanelli, M. J., et C. F. Basler. 2006. « Mutation of YMYL in the Nipah Virus Matrix Protein Abrogates Budding and Alters Subcellular Localization ». *Journal of Virology* 80 (24):12070-78. https://doi.org/10.1128/JVI.01743-06.

Ciancanelli, Michael J., Valentina A. Volchkova, Megan L. Shaw, Viktor E. Volchkov, et Christopher F. Basler. 2009. « Nipah Virus Sequesters Inactive STAT1 in the Nucleus via a P Gene-Encoded Mechanism ». *Journal of Virology* 83 (16):7828. https://doi.org/10.1128/JVI.02610-08.

Cong, Yu, Margaret R. Lentz, Abigail Lara, Isis Alexander, Christopher Bartos, J. Kyle Bohannon, Dima Hammoud, et al. 2017. « Loss in lung volume and changes in the immune response demonstrate disease progression in African green monkeys infected by small-particle aerosol and intratracheal exposure to Nipah virus ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (4). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005532.

Courtois, G., et A. Smahi. 2006. « NF-kappaB-Related Genetic Diseases ». *Cell Death and Differentiation* 13 (5):843-51. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401841.

Dai, Shengming, Lijun Jiang, Guisheng Wang, Xiangyang Zhou, Xiaomou Wei, Hongge Cheng, Zhen Wu, et Dong Wei. 2010. « HSP70 interacts with TRAF2 and differentially regulates TNFα signalling in human colon cancer cells ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (3):710-25. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00716.x.

Dhondt, Kévin P., et Branka Horvat. 2013. « Henipavirus Infections: Lessons from Animal Models ». *Pathogens* 2 (2):264. https://doi.org/10.3390/pathogens2020264.

Dhondt, Kévin P., Cyrille Mathieu, Marie Chalons, Joséphine M. Reynaud, Audrey Vallve, Hervé Raoul, et Branka Horvat. 2013. « Type I Interferon Signaling Protects Mice From Lethal Henipavirus Infection ». *Journal of Infectious Diseases* 207 (1):142-51. https://doi.org/10.1093/infdis/jis653.

Diederich, Sandra, Lena Thiel, et Andrea Maisner. 2008. « Role of Endocytosis and Cathepsin-Mediated Activation in Nipah Virus Entry ». *Virology* 375 (2):391-400. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.02.019.

Dietzel, Erik, Larissa Kolesnikova, Bevan Sawatsky, Anja Heiner, Michael Weis, Gary P. Kobinger, Stephan Becker, Veronika von Messling, et Andrea Maisner. 2016. « Nipah Virus Matrix Protein Influences Fusogenicity and Is Essential for Particle Infectivity and

Stability ». Édité par T. S. Dermody. *Journal of Virology* 90 (5):2514-22. https://doi.org/10.1128/JVI.02920-15.

Dondelinger, Yves, Maurice Darding, Mathieu J. M. Bertrand, et Henning Walczak. 2016. « Poly-Ubiquitination in TNFR1-Mediated Necroptosis ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (11-12):2165-76. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2191-4.

Drexler, Jan Felix, Victor Max Corman, Florian Gloza-Rausch, Antje Seebens, Augustina Annan, Anne Ipsen, Thomas Kruppa, et al. 2009. « Henipavirus RNA in African Bats ». *PLoS ONE* 4 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006367.

Eaton, Bryan T., Christopher C. Broder, Deborah Middleton, et Lin-Fa Wang. 2006. « Hendra and Nipah Viruses: Different and Dangerous ». *Nature Reviews Microbiology* 4 (1):23-35. https://doi.org/10.1038/nrmicro1323.

Enchéry, François, et Branka Horvat. 2017. « Understanding the Interaction between Henipaviruses and Their Natural Host, Fruit Bats: Paving the Way toward Control of Highly Lethal Infection in Humans ». *International Reviews of Immunology* 36 (2):108-21. https://doi.org/10.1080/08830185.2016.1255883.

Fogarty, Rhys, Kim Halpin, Alex D. Hyatt, Peter Daszak, et Bruce A. Mungall. 2008. « Henipavirus Susceptibility to Environmental Variables ». *Virus Research* 132 (1-2):140. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.010.

Freiberg, Alexander N., Melissa N. Worthy, Benhur Lee, et Michael R. Holbrook. 2010. « Combined Chloroquine and Ribavirin Treatment Does Not Prevent Death in a Hamster Model of Nipah and Hendra Virus Infection ». *The Journal of General Virology* 91 (Pt 3):765. https://doi.org/10.1099/vir.0.017269-0.

Freitas, Natália, et Celso Cunha. 2009. « Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins ». *Current Genomics* 10 (8):550-57. https://doi.org/10.2174/138920209789503941.

Fuentes, Sandra, Kim C. Tran, Priya Luthra, Michael N. Teng, et Biao He. 2007. « Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein ». *Journal of Virology* 81 (15):8361-66. https://doi.org/10.1128/JVI.02717-06.

Georges-Courbot, M. C., H. Contamin, C. Faure, P. Loth, S. Baize, P. Leyssen, J. Neyts, et V. Deubel. 2006. « Poly(I)-Poly(C12U) but Not Ribavirin Prevents Death in a Hamster Model of Nipah Virus Infection ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (5):1768. https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1768-1772.2006.

Gerondakis, Steve, et Ulrich Siebenlist. 2010. « Roles of the NF-kappaB Pathway in Lymphocyte Development and Function ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5):a000182. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000182.

Glennon, Nicole B., Omar Jabado, Michael K. Lo, et Megan L. Shaw. 2015. « Transcriptome Profiling of the Virus-Induced Innate Immune Response in Pteropus Vampyrus and Its Attenuation by Nipah Virus Interferon Antagonist Functions ». *Journal of Virology* 89 (15):7550. https://doi.org/10.1128/JVI.00302-15.

Goh, Khean Jin, Chong Tin Tan, Nee Kong Chew, Patrick Seow Koon Tan, Adeeba Kamarulzaman, Sazilah Ahmad Sarji, Kum Thong Wong, Basri Johan Jeet Abdullah, Kaw Bing Chua, et Sai Kit Lam. 2000. « Clinical Features of Nipah Virus Encephalitis among Pig Farmers in Malaysia ». *New England Journal of Medicine* 342 (17):1229-35. https://doi.org/10.1056/NEJM200004273421701.

Groitl, Bastian, Scott Horowitz, Karl A. T. Makepeace, Evgeniy V. Petrotchenko, Christoph H. Borchers, Dana Reichmann, James C. A. Bardwell, et Ursula Jakob. 2016. « Protein

Unfolding as a Switch from Self-Recognition to High-Affinity Client Binding ». *Nature Communications* 7 (janvier):ncomms10357. https://doi.org/10.1038/ncomms10357.

Grote, Michael, Elmar Wolf, Cindy L. Will, Ira Lemm, Dmitry E. Agafonov, Adrian Schomburg, Wolfgang Fischle, Henning Urlaub, et Reinhard Lührmann. 2010. « Molecular Architecture of the Human Prp19/CDC5L Complex ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (9):2105-19. https://doi.org/10.1128/MCB.01505-09.

Gurley, Emily S., Sonia T. Hegde, Kamal Hossain, Hossain M.S. Sazzad, M. Jahangir Hossain, Mahmudur Rahman, M.A. Yushuf Sharker, et al. 2017. « Convergence of Humans, Bats, Trees, and Culture in Nipah Virus Transmission, Bangladesh ». *Emerging Infectious Diseases* 23 (9):1446-53. https://doi.org/10.3201/eid2309.161922.

Hagmaier, Kathrin, Nicola Stock, Steve Goodbourn, Lin-Fa Wang, et Richard Randall. 2006. « A Single Amino Acid Substitution in the V Protein of Nipah Virus Alters Its Ability to Block Interferon Signalling in Cells from Different Species ». *The Journal of General Virology* 87 (Pt 12):3649. https://doi.org/10.1099/vir.0.82261-0.

Hahn, Micah B., Jonathan H. Epstein, Emily S. Gurley, Mohammad S. Islam, Stephen P. Luby, Peter Daszak, et Jonathan A. Patz. 2014. « Roosting behaviour and habitat selection of Pteropus giganteus reveals potential links to Nipah virus epidemiology ». *The Journal of applied ecology* 51 (2):376-87. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12212.

Halpin, Kim, Bettina Bankamp, Brian H. Harcourt, William J. Bellini, et Paul A. Rota. 2004. « Nipah Virus Conforms to the Rule of Six in a Minigenome Replication Assay ». *The Journal of General Virology* 85 (Pt 3):701-7. https://doi.org/10.1099/vir.0.19685-0.

Halpin, Kim, Alex D. Hyatt, Rhys Fogarty, Deborah Middleton, John Bingham, Jonathan H. Epstein, Sohayati Abdul Rahman, et al. 2011. « Pteropid Bats Are Confirmed as the Reservoir Hosts of Henipaviruses: A Comprehensive Experimental Study of Virus Transmission ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85 (5):946. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0567.

Harcourt, Brian H., Luis Lowe, Azaibi Tamin, Xin Liu, Bettina Bankamp, Nadine Bowden, Pierre E. Rollin, et al. 2005. « Genetic Characterization of Nipah Virus, Bangladesh, 2004 ». *Emerging Infectious Diseases* 11 (10):1594-97. https://doi.org/10.3201/eid1110.050513.

Harcourt, Brian H., Azaibi Tamin, Kim Halpin, Thomas G. Ksiazek, Pierre E. Rollin, William J. Bellini, et Paul A. Rota. 2001. « Molecular Characterization of the Polymerase Gene and Genomic Termini of Nipah Virus ». *Virology* 287 (1):192-201. https://doi.org/10.1006/viro.2001.1026.

Harcourt, Brian H., Azaibi Tamin, Thomas G. Ksiazek, Pierre E. Rollin, Larry J. Anderson, William J. Bellini, et Paul A. Rota. 2000. « Molecular Characterization of Nipah Virus, a Newly Emergent Paramyxovirus ». *Virology* 271 (2):334-49. https://doi.org/10.1006/viro.2000.0340.

Harit, A. K., R. L. Ichhpujani, Sunil Gupta, K. S. Gill, Shiv Lal, N. K. Ganguly, et S. P. Agarwal. 2006. « Nipah/Hendra Virus Outbreak in Siliguri, West Bengal, India in 2001 ». *The Indian Journal of Medical Research* 123 (4):553-60.

Hasebe, Futoshi, Nguyen Thi Thu Thuy, Shingo Inoue, Fuxun Yu, Yoshihiro Kaku, Shumpei Watanabe, Hiroomi Akashi, Dang Tuan Dat, Le Thi Quynh Mai, et Kouichi Morita. 2012. « Serologic Evidence of Nipah Virus Infection in Bats, Vietnam ». *Emerging Infectious Diseases* 18 (3):536. https://doi.org/10.3201/eid1803.111121.

Hayden, Matthew S., et Sankar Ghosh. 2008. « Shared Principles in NF-kappaB Signaling ». *Cell* 132 (3):344-62. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020.

———. 2012. « NF-κB, the First Quarter-Century: Remarkable Progress and Outstanding Questions ». *Genes & Development* 26 (3):203-34. https://doi.org/10.1101/gad.183434.111.

Hayman, David T. S., Lin-Fa Wang, Jennifer Barr, Kate S. Baker, Richard Suu-Ire, Christopher C. Broder, Andrew A. Cunningham, et James L. N. Wood. 2011. « Antibodies to Henipavirus or Henipa-Like Viruses in Domestic Pigs in Ghana, West Africa ». *PLoS ONE* 6 (9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025256.

Heyninck, Karen, Sofie Van Huffel, Marja Kreike, et Rudi Beyaert. 2004. « Yeast Two-Hybrid Screening for Proteins Interacting with the Anti-Apoptotic Protein A20 ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 282:223-41. https://doi.org/10.1385/1-59259-812-9:223.

Hoffmann, Markus, Marcel Alexander Müller, Jan Felix Drexler, Jörg Glende, Meike Erdt, Tim Gützkow, Christoph Losemann, et al. 2013. « Differential Sensitivity of Bat Cells to Infection by Enveloped RNA Viruses: Coronaviruses, Paramyxoviruses, Filoviruses, and Influenza Viruses ». *PloS One* 8 (8):e72942. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072942.

Hsu, Vincent P., Mohammed Jahangir Hossain, Umesh D. Parashar, Mohammed Monsur Ali, Thomas G. Ksiazek, Ivan Kuzmin, Michael Niezgoda, Charles Rupprecht, Joseph Bresee, et Robert F. Breiman. 2004. « Nipah Virus Encephalitis Reemergence, Bangladesh ». *Emerging Infectious Diseases* 10 (12):2082-87. https://doi.org/10.3201/eid1012.040701.

Hu, Yani, Kaitlin O'Boyle, Jim Auer, Sagar Raju, Fuping You, Penghua Wang, Erol Fikrig, et Richard E. Sutton. 2017. « Multiple UBXN family members inhibit retrovirus and lentivirus production and canonical NFκB signaling by stabilizing IκBα ». *PLoS Pathogens* 13 (2). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006187.

Huang, Mingshu, Hiroki Sato, Kyoji Hagiwara, Akira Watanabe, Akihiro Sugai, Fusako Ikeda, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Misako Yoneda, et Chieko Kai. 2011. « Determination of a Phosphorylation Site in Nipah Virus Nucleoprotein and Its Involvement in Virus Transcription ». *The Journal of General Virology* 92 (Pt 9):2133. https://doi.org/10.1099/vir.0.032342-0.

Hughes, James M., Mary E. Wilson, Kim Halpin, Alexander D. Hyatt, Raina K. Plowright, Jonathan H. Epstein, Peter Daszak, et al. 2007. « Emerging Viruses: Coming in on a Wrinkled Wing and a Prayer ». *Clinical Infectious Diseases* 44 (5):711-17. https://doi.org/10.1086/511078.

Hyatt, Alex D., Sherif R. Zaki, Cynthia S. Goldsmith, Terry G. Wise, et Sandra G. Hengstberger. 2001. « Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals ». *Microbes and Infection* 3 (4):297-306. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01383-1.

Iehlé, Catherine, Girard Razafitrimo, Josette Razainirina, Nicole, Andriaholinirina, Steven M. Goodman, Caroline Faure, Marie-Claude Georges-Courbot, Dominique Rousset, et Jean-Marc Reynes. 2007. « Henipavirus and Tioman Virus Antibodies in Pteropodid Bats, Madagascar ». *Emerging Infectious Diseases* 13 (1):159. https://doi.org/10.3201/eid1301.060791.

International Society for Infection Diseases. 2015. « PRO/AH> Nipah virus, bats - New Caledonia, RFI », 14 mai 2015. http://www.promedmail.org/direct.php?id=20150514.3360650.

Irie, Takashi, Katsuhiro Kiyotani, Tomoki Igarashi, Asuka Yoshida, et Takemasa Sakaguchi. 2012. « Inhibition of Interferon Regulatory Factor 3 Activation by Paramyxovirus V Protein ». *Journal of Virology* 86 (13):7136. https://doi.org/10.1128/JVI.06705-11.

Islam, M. Saiful, Hossain M. S. Sazzad, Syed Moinuddin Satter, Sharmin Sultana, M. Jahangir Hossain, Murshid Hasan, Mahmudur Rahman, et al. 2016. « Nipah Virus Transmission from Bats to Humans Associated with Drinking Traditional Liquor Made from Date Palm Sap, Bangladesh, 2011–2014 ». *Emerging Infectious Diseases* 22 (4):664. https://doi.org/10.3201/eid2204.151747.

Ivashkiv, Lionel B., et Laura T. Donlin. 2014. « Regulation of Type I Interferon Responses ». *Nature Reviews. Immunology* 14 (1):36. https://doi.org/10.1038/nri3581.

Iwai, Kazuhiro. 2014. « Diverse Roles of the Ubiquitin System in NF-κB Activation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (1):129-36. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.011.

Izaguirre, Alexander, Betsy J. Barnes, Sheela Amrute, Wen-Shuz Yeow, Nicholas Megjugorac, Jihong Dai, Di Feng, Eugene Chung, Paula M. Pitha, et Patricia Fitzgerald-Bocarsly. 2003. « Comparative Analysis of IRF and IFN-Alpha Expression in Human Plasmacytoid and Monocyte-Derived Dendritic Cells ». *Journal of Leukocyte Biology* 74 (6):1125-38. https://doi.org/10.1189/jlb.0603255.

Jiang, Haiying, Juan Li, Linmiao Li, Xiujuan Zhang, Lihong Yuan, et Jinping Chen. 2017. « Selective Evolution of Toll-like Receptors 3, 7, 8, and 9 in Bats ». *Immunogenetics* 69 (4):271-85. https://doi.org/10.1007/s00251-016-0966-2.

Johnson, Catherine, Sandra Crowther, Margaret J. Stafford, David G. Campbell, Rachel Toth, et Carol MacKintosh. 2010. « Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites ». *Biochemical Journal* 427 (Pt 1):69-78. https://doi.org/10.1042/BJ20091834.

Journo, Chloé, Amandine Bonnet, Arnaud Favre-Bonvin, Jocelyn Turpin, Jennifer Vinera, Emilie Côté, Sébastien Alain Chevalier, et al. 2013. « Human T Cell Leukemia Virus Type 2 Tax-Mediated NF-κB Activation Involves a Mechanism Independent of Tax Conjugation to Ubiquitin and SUMO ». *Journal of Virology* 87 (2):1123-36. https://doi.org/10.1128/JVI.01792-12.

Kang, Ho-Bum, Young-Eun Kim, Hyung-Joo Kwon, Dai-Eun Sok, et Younghee Lee. 2007. « Enhancement of NF-kappaB Expression and Activity upon Differentiation of Human Embryonic Stem Cell Line SNUhES3 ». *Stem Cells and Development* 16 (4):615-23. https://doi.org/10.1089/scd.2007.0014.

Kolakofsky, Daniel, Laurent Roux, Dominique Garcin, et Rob W. H. Ruigrok. 2005. « Paramyxovirus mRNA editing, the 'rule of six' and error catastrophe: a hypothesis ». *Journal of General Virology* 86 (7):1869-77. https://doi.org/10.1099/vir.0.80986-0.

Komarova, Anastassia V., Chantal Combredet, Laurène Meyniel-Schicklin, Manuel Chapelle, Grégory Caignard, Jean-Michel Camadro, Vincent Lotteau, Pierre-Olivier Vidalain, et Frédéric Tangy. 2011. « Proteomic Analysis of Virus-Host Interactions in an Infectious Context Using Recombinant Viruses ». *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 10 (12). https://doi.org/10.1074/mcp.M110.007443.

Kulkarni, Sachin, Valentina Volchkova, Christopher F. Basler, Peter Palese, Viktor E. Volchkov, et Megan L. Shaw. 2009. « Nipah Virus Edits Its P Gene at High Frequency To Express the V and W Proteins ». *Journal of Virology* 83 (8):3982. https://doi.org/10.1128/JVI.02599-08.

Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, et al. 2000. « Pattern Recognition Receptors TLR4 and CD14 Mediate Response to

Respiratory Syncytial Virus ». *Nature Immunology* 1 (5):398-401. https://doi.org/10.1038/80833.

Lam, Sai-Kit. 2003. « Nipah virus—a potential agent of bioterrorism? » *Antiviral Research*, Viral Bioterrorism and Biodefence, 57 (1–2):113-19. https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00204-8.

Lässig, Charlotte, et Karl-Peter Hopfner. 2017. « Discrimination of Cytosolic Self and Non-Self RNA by RIG-I-like Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (22):9000-9009. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.788398.

Lenardo, M. J., C. M. Fan, T. Maniatis, et D. Baltimore. 1989. « The Involvement of NF-Kappa B in Beta-Interferon Gene Regulation Reveals Its Role as Widely Inducible Mediator of Signal Transduction ». *Cell* 57 (2):287-94.

Lenardo, M., J. W. Pierce, et D. Baltimore. 1987. « Protein-Binding Sites in Ig Gene Enhancers Determine Transcriptional Activity and Inducibility ». *Science (New York, N.Y.)* 236 (4808):1573-77.

Li, Yan, Jianmin Wang, Andrew C. Hickey, Yunzhi Zhang, Yuchun Li, Yi Wu, Huajun Zhang, et al. 2008. « Antibodies to Nipah or Nipah-like Viruses in Bats, China ». *Emerging Infectious Diseases* 14 (12):1974-76. https://doi.org/10.3201/eid1412.080359.

Lieu, Kim G., Glenn A. Marsh, Lin-Fa Wang, et Hans J. Netter. 2015. « The non-pathogenic Henipavirus Cedar paramyxovirus phosphoprotein has a compromised ability to target STAT1 and STAT2 ». *Antiviral Research* 124:69-76. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.09.017.

Lim, C. C. Tchoyoson, Yih Yian Sitoh, Francis Hui, Kim En Lee, Brenda S. P. Ang, Erle Lim, Winston E. H. Lim, et al. 2000. « Nipah Viral Encephalitis or Japanese Encephalitis? MR Findings in a New Zoonotic Disease ». *American Journal of Neuroradiology* 21 (3):455-61.

Liu, Helene Minyi, Yueh-Ming Loo, Stacy M. Horner, Gregory A. Zornetzer, Michael G. Katze, et Michael Gale. 2012. « The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3ε regulates a RIG-I translocon that mediates membrane-association and innate antiviral immunity ». *Cell host & microbe* 11 (5):528-37. https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.006.

Lo, Michael K., Brian H. Harcourt, Bruce A. Mungall, Azaibi Tamin, Mark E. Peeples, William J. Bellini, et Paul A. Rota. 2009. « Determination of the henipavirus phosphoprotein gene mRNA editing frequencies and detection of the C, V and W proteins of Nipah virus in virus-infected cells ». *Journal of General Virology* 90 (2):398-404. https://doi.org/10.1099/vir.0.007294-0.

Lo, Michael K., David Miller, Mohammad Aljofan, Bruce A. Mungall, Pierre E. Rollin, William J. Bellini, et Paul A. Rota. 2010. « Characterization of the Antiviral and Inflammatory Responses against Nipah Virus in Endothelial Cells and Neurons ». *Virology* 404 (1):78-88. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.005.

Lo, Michael K., Mark E. Peeples, William J. Bellini, Stuart T. Nichol, Paul A. Rota, et Christina F. Spiropoulou. 2012. « Distinct and Overlapping Roles of Nipah Virus P Gene Products in Modulating the Human Endothelial Cell Antiviral Response ». *PLoS ONE* 7 (10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047790.

Lo, Michael K., Teit Max Søgaard, et David G. Karlin. 2014. « Evolution and Structural Organization of the C Proteins of Paramyxovirinae ». *PLoS ONE* 9 (2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090003.

Longhi, Sonia, Louis-Marie Bloyet, Stefano Gianni, et Denis Gerlier. 2017. « How Order and Disorder within Paramyxoviral Nucleoproteins and Phosphoproteins Orchestrate the

Molecular Interplay of Transcription and Replication ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 74 (17):3091-3118. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2556-3.

Louber, Jade, Joanna Brunel, Emiko Uchikawa, Stephen Cusack, et Denis Gerlier. 2015. « Kinetic Discrimination of Self/non-Self RNA by the ATPase Activity of RIG-I and MDA5 ». *BMC Biology* 13 (juillet):54. https://doi.org/10.1186/s12915-015-0166-9.

Luby, Stephen P., Mahmudur Rahman, M. Jahangir Hossain, Lauren S. Blum, M. Mushtaq Husain, Emily Gurley, Rasheda Khan, et al. 2006. « Foodborne Transmission of Nipah Virus, Bangladesh ». *Emerging Infectious Diseases* 12 (12):1888. https://doi.org/10.3201/eid1212.060732.

Luco, Sophie, Olivier Delmas, Pierre-Olivier Vidalain, Frédéric Tangy, Robert Weil, et Hervé Bourhy. 2012. « RelAp43, a Member of the NF-κB Family Involved in Innate Immune Response against Lyssavirus Infection ». *PLoS Pathogens* 8 (12). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003060.

Ludlow, Louise E., Michael K. Lo, Jason J. Rodriguez, Paul A. Rota, et Curt M. Horvath. 2008. « Henipavirus V Protein Association with Polo-Like Kinase Reveals Functional Overlap with STAT1 Binding and Interferon Evasion ». *Journal of Virology* 82 (13):6259. https://doi.org/10.1128/JVI.00409-08.

Luis, Angela D., David T. S. Hayman, Thomas J. O'Shea, Paul M. Cryan, Amy T. Gilbert, Juliet R. C. Pulliam, James N. Mills, et al. 2013. « A Comparison of Bats and Rodents as Reservoirs of Zoonotic Viruses: Are Bats Special? » *Proceedings. Biological Sciences* 280 (1756):20122753. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753.

Mackay, Fabienne, et Michael P. Cancro. 2006. « Travelling with the BAFF/BLyS Family: Are We There Yet? » *Seminars in Immunology* 18 (5):261-62. https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.07.003.

Magoffin, D. E., K. Halpin, P. A. Rota, et L.-F. Wang. 2007. « Effects of Single Amino Acid Substitutions at the E Residue in the Conserved GDNE Motif of the Nipah Virus Polymerase (L) Protein ». *Archives of Virology* 152 (4):827-32. https://doi.org/10.1007/s00705-006-0881-1.

Marianneau, Philippe, Vanessa Guillaume, Thong Wong, Munisamy Badmanathan, Ren Yih Looi, Severine Murri, Philippe Loth, et al. 2010. « Experimental Infection of Squirrel Monkeys with Nipah Virus ». *Emerging Infectious Diseases* 16 (3):507-10. https://doi.org/10.3201/eid1603.091346.

Marsh, Glenn A., Carol de Jong, Jennifer A. Barr, Mary Tachedjian, Craig Smith, Deborah Middleton, Meng Yu, et al. 2012. « Cedar Virus: A Novel Henipavirus Isolated from Australian Bats ». *PLoS Pathogens* 8 (8). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002836.

Marsh, Glenn A, et Lin-Fa Wang. 2012. « Hendra and Nipah viruses: why are they so deadly? » *Current Opinion in Virology*, Viral pathogenesis/Vaccines, 2 (3):242-47. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.006.

Martinez-Gil, Luis, Natalia M. Vera-Velasco, et Ismael Mingarro. 2017. « Exploring the Human-Nipah Virus Protein-Protein Interactions ». *Journal of Virology*, septembre. https://doi.org/10.1128/JVI.01461-17.

Mathieu, C., C. Pohl, J. Szecsi, S. Trajkovic-Bodennec, S. Devergnas, H. Raoul, F.-L. Cosset, D. Gerlier, T. F. Wild, et B. Horvat. 2011. « Nipah Virus Uses Leukocytes for Efficient Dissemination within a Host ». *Journal of Virology* 85 (15):7863-71. https://doi.org/10.1128/JVI.00549-11.

Mathieu, Cyrille, Kévin P. Dhondt, Marie Châlons, Stéphane Mély, Hervé Raoul, Didier Negre, François-Loïc Cosset, Denis Gerlier, Romain R. Vivès, et Branka Horvat. 2015. « Heparan Sulfate-Dependent Enhancement of Henipavirus Infection ». *mBio* 6 (2):e02427-14. https://doi.org/10.1128/mBio.02427-14.

Mathieu, Cyrille, Vanessa Guillaume, Amélie Sabine, Kien Chai Ong, Kum Thong Wong, Catherine Legras-Lachuer, et Branka Horvat. 2012. « Lethal Nipah Virus Infection Induces Rapid Overexpression of CXCL10 ». *PloS One* 7 (2):e32157. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032157.

Mathieu, Cyrille, Vanessa Guillaume, Valentina A. Volchkova, Christine Pohl, Frederique Jacquot, Ren Yih Looi, Kum Thong Wong, et al. 2012. « Nonstructural Nipah Virus C Protein Regulates Both the Early Host Proinflammatory Response and Viral Virulence ». *Journal of Virology* 86 (19):10766. https://doi.org/10.1128/JVI.01203-12.

Meylan, Etienne, et Jürg Tschopp. 2005. « The RIP Kinases: Crucial Integrators of Cellular Stress ». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (3):151-59. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.01.003.

Middleton, D. J., C. J. Morrissy, B. M. van der Heide, G. M. Russell, M. A. Braun, H. A. Westbury, K. Halpin, et P. W. Daniels. 2007. « Experimental Nipah Virus Infection in Pteropid Bats (Pteropus poliocephalus) ». *Journal of Comparative Pathology* 136 (4):266-72. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.03.002.

Middleton, D. J., H. A. Westbury, C. J. Morrissy, B. M. van der Heide, G. M. Russell, M. A. Braun, et A. D. Hyatt. 2002. « Experimental Nipah Virus Infection in Pigs and Cats ». *Journal of Comparative Pathology* 126 (2):124-36. https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0532.

Middleton, Deborah, Jackie Pallister, Reuben Klein, Yan-Ru Feng, Jessica Haining, Rachel Arkinstall, Leah Frazer, et al. 2014. « Hendra Virus Vaccine, a One Health Approach to Protecting Horse, Human, and Environmental Health ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (3):372. https://doi.org/10.3201/eid2003.131159.

Miller, B. S., et E. Zandi. 2001. « Complete Reconstitution of Human IkappaB Kinase (IKK) Complex in Yeast. Assessment of Its Stoichiometry and the Role of IKKgamma on the Complex Activity in the Absence of Stimulation ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (39):36320-26. https://doi.org/10.1074/jbc.M104051200.

Mills, James N., Asiah N. M. Alim, Michel L. Bunning, Ong Bee Lee, Kent D. Wagoner, Brian R. Amman, Patrick C. Stockton, et Thomas G. Ksiazek. 2009. « Nipah Virus Infection in Dogs, Malaysia, 1999 ». *Emerging Infectious Diseases* 15 (6):950. https://doi.org/10.3201/eid1506.080453.

Mire, Chad E., Benjamin A. Satterfield, Joan B. Geisbert, Krystle N. Agans, Viktoriya Borisevich, Lianying Yan, Yee-Peng Chan, et al. 2016. « Pathogenic Differences between Nipah Virus Bangladesh and Malaysia Strains in Primates: Implications for Antibody Therapy ». *Scientific Reports* 6 (août):30916. https://doi.org/10.1038/srep30916.

Mohd Nor, M. N., C. H. Gan, et B. L. Ong. 2000. « Nipah Virus Infection of Pigs in Peninsular Malaysia ». *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 19 (1):160-65.

Motz, Carina, Kerstin Monika Schuhmann, Axel Kirchhofer, Manuela Moldt, Gregor Witte, Karl-Klaus Conzelmann, et Karl-Peter Hopfner. 2013. « Paramyxovirus V Proteins Disrupt the Fold of the RNA Sensor MDA5 to Inhibit Antiviral Signaling ». *Science* 339 (6120):690-93. https://doi.org/10.1126/science.1230949.

Munster, Vincent J., Joseph B. Prescott, Trenton Bushmaker, Dan Long, Rebecca Rosenke, Tina Thomas, Dana Scott, Elizabeth R. Fischer, Heinz Feldmann, et Emmie de Wit. 2012.

« Rapid Nipah virus entry into the central nervous system of hamsters via the olfactory route ». *Scientific Reports* 2 (octobre). https://doi.org/10.1038/srep00736.

Murphy, Samantha H., Kotaro Suzuki, Michael Downes, Genevieve L. Welch, Paul De Jesus, Loren J. Miraglia, Anthony P. Orth, Sumit K. Chanda, Ronald M. Evans, et Inder M. Verma. 2011. « Tumor suppressor protein (p)53, is a regulator of NF-κB repression by the glucocorticoid receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (41):17117-22. https://doi.org/10.1073/pnas.1114420108.

Muslin, Anthony J, et Heming Xing. 2000. « 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference ». *Cellular Signalling* 12 (11):703-9. https://doi.org/10.1016/S0898-6568(00)00131-5.

Nahar, Nazmun, Utpal Kumar Mondal, M. Jahangir Hossain, M. Salah Uddin Khan, Rebeca Sultana, Emily S. Gurley, et Stephen P. Luby. 2014. « Piloting the Promotion of Bamboo Skirt Barriers to Prevent Nipah Virus Transmission through Date Palm Sap in Bangladesh ». *Global Health Promotion* 21 (4):7. https://doi.org/10.1177/1757975914528249.

« NF-kB Target Genes » NF-kB Transcription Factors | Boston University ». s. d. Consulté le 30 mai 2017. http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/.

Nishikori Momoko. 2005. « Classical and Alternative NF.KAPPA.B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies ». 2005. https://www.researchgate.net/publication/244947830_Classical_and_Alternative_NFKAPPAB_Activation_Pathways_and_Their_Roles_in_Lymphoid_Malignancies.

« NLS Mapper ». s. d. Consulté le 9 juillet 2017. http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi.

Noton, Sarah L., et Rachel Fearns. 2015. « INITIATION AND REGULATION OF PARAMYXOVIRUS TRANSCRIPTION AND REPLICATION ». *Virology* 0 (mai):545. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.014.

Ogino, Tomoaki, Satya P. Yadav, et Amiya K. Banerjee. 2010. « Histidine-mediated RNA transfer to GDP for unique mRNA capping by vesicular stomatitis virus RNA polymerase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (8):3463-68. https://doi.org/10.1073/pnas.0913083107.

Pager, Cara Theresia, Willie Warren Craft Jr., Jared Patch, et Rebecca Ellis Dutch. 2006. « A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L ». *Virology* 346 (2):251-57. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.007.

Panne, Daniel, Tom Maniatis, et Stephen C. Harrison. 2007. « An atomic model of enhanceosome structure in the vicinity of DNA ». *Cell* 129 (6):1111-23. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.019.

Parisien, Jean-Patrick, Darja Bamming, Akihiko Komuro, Aparna Ramachandran, Jason J. Rodriguez, Glen Barber, Robert D. Wojahn, et Curt M. Horvath. 2009. « A Shared Interface Mediates Paramyxovirus Interference with Antiviral RNA Helicases MDA5 and LGP2 ». *Journal of Virology* 83 (14):7252-60. https://doi.org/10.1128/JVI.00153-09.

Park, Arnold, Tatyana Yun, Frederic Vigant, Olivier Pernet, Sohui T. Won, Brian E. Dawes, Wojciech Bartkowski, Alexander N. Freiberg, et Benhur Lee. 2016. « Nipah Virus C Protein Recruits Tsg101 to Promote the Efficient Release of Virus in an ESCRT-

Dependent Pathway ». Édité par Robert A Lamb. *PLOS Pathogens* 12 (5):e1005659. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005659.

Patch, Jared R, Ziying Han, Sarah E McCarthy, Lianying Yan, Lin-Fa Wang, Ronald N Harty, et Christopher C Broder. 2008. « The YPLGVG Sequence of the Nipah Virus Matrix Protein Is Required for Budding ». *Virology Journal* 5 (1):137. https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-137.

Paton, Nicholas I, Yee Sin Leo, Sherif R Zaki, Alexander P Auchus, Kim En Lee, Ai Ee Ling, Suok Kai Chew, et al. 1999. « Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore ». *The Lancet* 354 (9186):1253-56. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04379-2.

Pelzer, Christiane, et Margot Thome. 2011. « IKKα Takes Control of Canonical NF-κB Activation ». *Nature Immunology* 12 (9):815-16. https://doi.org/10.1038/ni.2082.

Pène, Sabrina, Laetitia Waast, Amandine Bonnet, Laurence Bénit, et Claudine Pique. 2014. « A Non-SUMOylated Tax Protein Is Still Functional for NF-κB Pathway Activation ». *Journal of Virology* 88 (18):10655-61. https://doi.org/10.1128/JVI.01827-14.

Pernet, Olivier, Christine Pohl, Michelle Ainouze, Hasan Kweder, et Robin Buckland. 2009. « Nipah Virus Entry Can Occur by Macropinocytosis ». *Virology* 395 (2):298-311. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.016.

Pernet, Olivier, Bradley S. Schneider, Shannon M. Beaty, Matthew LeBreton, Tatyana E. Yun, Arnold Park, Trevor T. Zachariah, et al. s. d. « Evidence for Henipavirus Spillover into Human Populations in Africa ». *Nature Communications* 5. Consulté le 5 novembre 2016. https://doi.org/10.1038/ncomms6342.

Pfaller, Christian K., et Karl-Klaus Conzelmann. 2008. « Measles Virus V Protein Is a Decoy Substrate for IκB Kinase α and Prevents Toll-Like Receptor 7/9-Mediated Interferon Induction ». *Journal of Virology* 82 (24):12365. https://doi.org/10.1128/JVI.01321-08.

Pfaller, Christian K., George M. Mastorakos, William E. Matchett, Xiao Ma, Charles E. Samuel, et Roberto Cattaneo. 2015. « Measles Virus Defective Interfering RNAs Are Generated Frequently and Early in the Absence of C Protein and Can Be Destabilized by Adenosine Deaminase Acting on RNA-1-Like Hypermutations ». *Journal of Virology* 89 (15):7735. https://doi.org/10.1128/JVI.01017-15.

Poch, O, I Sauvaget, M Delarue, et N Tordo. 1989. « Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. » *The EMBO Journal* 8 (12):3867-74.

Porotto, Matteo, Barry Rockx, Christine C. Yokoyama, Aparna Talekar, Ilaria DeVito, Laura M. Palermo, Jie Liu, et al. 2010. « Inhibition of Nipah Virus Infection In Vivo: Targeting an Early Stage of Paramyxovirus Fusion Activation during Viral Entry ». *PLoS Pathogens* 6 (10). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001168.

Rahmeh, Amal A., Jianrong Li, Philip J. Kranzusch, et Sean P. J. Whelan. 2009. « Ribose 2'-O Methylation of the Vesicular Stomatitis Virus mRNA Cap Precedes and Facilitates Subsequent Guanine-N-7 Methylation by the Large Polymerase Protein ». *Journal of Virology* 83 (21):11043-50. https://doi.org/10.1128/JVI.01426-09.

Rahmeh, Amal A., Andreas D. Schenk, Eric I. Danek, Philip J. Kranzusch, Bo Liang, Thomas Walz, et Sean P. J. Whelan. 2010. « Molecular architecture of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (46):20075-80. https://doi.org/10.1073/pnas.1013559107.

Ramachandran, Aparna, et Curt M. Horvath. 2009. « Paramyxovirus Disruption of Interferon Signal Transduction: STATus Report ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29 (9):531-37. https://doi.org/10.1089/jir.2009.0070.

Reimers, Kerstin, Katja Buchholz, et Hermann Werchau. 2005. « Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Induces the Activation of Nuclear Factor Kappa B ». *Virology* 331 (2):260-68. https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.031.

Reynes, Jean-Marc, Dorian Counor, Sivuth Ong, Caroline Faure, Vansay Seng, Sophie Molia, Joe Walston, Marie Claude Georges-Courbot, Vincent Deubel, et Jean-Louis Sarthou. 2005. « Nipah Virus in Lyle's Flying Foxes, Cambodia ». *Emerging Infectious Diseases* 11 (7):1042. https://doi.org/10.3201/eid1107.041350.

Rockx, Barry, Katharine N. Bossart, Friederike Feldmann, Joan B. Geisbert, Andrew C. Hickey, Douglas Brining, Julie Callison, et al. 2010. « A Novel Model of Lethal Hendra Virus Infection in African Green Monkeys and the Effectiveness of Ribavirin Treatment ». *Journal of Virology* 84 (19):9831. https://doi.org/10.1128/JVI.01163-10.

Rodriguez, Jason J., Cristian D. Cruz, et Curt M. Horvath. 2004. « Identification of the Nuclear Export Signal and STAT-Binding Domains of the Nipah Virus V Protein Reveals Mechanisms Underlying Interferon Evasion ». *Journal of Virology* 78 (10):5358. https://doi.org/10.1128/JVI.78.10.5358-5367.2004.

Rodriguez, Jason J., Jean-Patrick Parisien, et Curt M. Horvath. 2002. « Nipah Virus V Protein Evades Alpha and Gamma Interferons by Preventing STAT1 and STAT2 Activation and Nuclear Accumulation ». *Journal of Virology* 76 (22):11476. https://doi.org/10.1128/JVI.76.22.11476-11483.2002.

Rodriguez, Kenny R., et Curt M. Horvath. 2013. « Amino Acid Requirements for MDA5 and LGP2 Recognition by Paramyxovirus V Proteins: A Single Arginine Distinguishes MDA5 from RIG-I ». *Journal of Virology* 87 (5):2974. https://doi.org/10.1128/JVI.02843-12.

Salminen, Antero, Tuomas Paimela, Tiina Suuronen, et Kai Kaarniranta. 2008. « Innate Immunity Meets with Cellular Stress at the IKK Complex: Regulation of the IKK Complex by HSP70 and HSP90 ». *Immunology Letters* 117 (1):9-15. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.12.017.

Satterfield, Benjamin A., Robert W. Cross, Karla A. Fenton, Krystle N. Agans, Christopher F. Basler, Thomas W. Geisbert, et Chad E. Mire. 2015. « The Immunomodulating V and W Proteins of Nipah Virus Determine Disease Course ». *Nature Communications* 6. https://doi.org/10.1038/ncomms8483.

Satterfield, Benjamin A., Robert W. Cross, Karla A. Fenton, Viktoriya Borisevich, Krystle N. Agans, Daniel J. Deer, Jessica Graber, Christopher F. Basler, Thomas W. Geisbert, et Chad E. Mire. 2016. « Nipah Virus C and W Proteins Contribute to Respiratory Disease in Ferrets ». *Journal of Virology* 90 (14):6326-43. https://doi.org/10.1128/JVI.00215-16.

Schlee, Martin, et Gunther Hartmann. 2010. « The Chase for the RIG-I Ligand—Recent Advances ». *Molecular Therapy* 18 (7):1254-62. https://doi.org/10.1038/mt.2010.90.

Schneeberger, Karin, Gábor Á Czirják, et Christian C. Voigt. 2013. « Inflammatory Challenge Increases Measures of Oxidative Stress in a Free-Ranging, Long-Lived Mammal ». *Journal of Experimental Biology* 216 (24):4514-19. https://doi.org/10.1242/jeb.090837.

Schoggins, John W., et Charles M. Rice. 2011. « Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions ». *Current opinion in virology* 1 (6):519-25. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008.

Schuhmann, Kerstin M., Christian K. Pfaller, et Karl-Klaus Conzelmann. 2011. « The Measles Virus V Protein Binds to p65 (RelA) To Suppress NF-κB Activity ». *Journal of Virology* 85 (7):3162. https://doi.org/10.1128/JVI.02342-10.

Schuster, Tobias B., Victor Costina, Peter Findeisen, Michael Neumaier, et Parviz Ahmad-Nejad. 2011. « Identification and Functional Characterization of 14-3-3 in TLR2 Signaling ». *Journal of Proteome Research* 10 (10):4661-70. https://doi.org/10.1021/pr200461p.

Sejvar, James J., Jahangir Hossain, Sankar Kama Saha, Emily S. Gurley, Shakila Banu, Jena D. Hamadani, Mohammed Abdul Faiz, et al. 2007. « Long-Term Neurological and Functional Outcome in Nipah Virus Infection ». *Annals of Neurology* 62 (3):235-42. https://doi.org/10.1002/ana.21178.

Selvey, L. A., R. M. Wells, J. G. McCormack, A. J. Ansford, K. Murray, R. J. Rogers, P. S. Lavercombe, P. Selleck, et J. W. Sheridan. 1995. « Infection of Humans and Horses by a Newly Described Morbillivirus ». *The Medical Journal of Australia* 162 (12):642-45.

Sen, Ranjan, et David Baltimore. 2006. « Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences. Cell 1986. 46: 705-716 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (11):7485-96.

Sendow, I., H. E. Field, A. Adjid, A. Ratnawati, A. C. Breed, null Darminto, C. Morrissy, et P. Daniels. 2010. « Screening for Nipah Virus Infection in West Kalimantan Province, Indonesia ». *Zoonoses and Public Health* 57 (7-8):499-503. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01252.x.

Shaw, M. L., W. B. Cardenas, D. Zamarin, P. Palese, et C. F. Basler. 2005. « Nuclear Localization of the Nipah Virus W Protein Allows for Inhibition of Both Virus- and Toll-Like Receptor 3-Triggered Signaling Pathways ». *Journal of Virology* 79 (10):6078-88. https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6078-6088.2005.

Shaw, Megan L., Adolfo García-Sastre, Peter Palese, et Christopher F. Basler. 2004. « Nipah Virus V and W Proteins Have a Common STAT1-Binding Domain yet Inhibit STAT1 Activation from the Cytoplasmic and Nuclear Compartments, Respectively ». *Journal of Virology* 78 (11):5633. https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5633-5641.2004.

Shi, Yongsheng, Bharat Reddy, et James L. Manley. 2006. « PP1/PP2A Phosphatases Are Required for the Second Step of Pre-mRNA Splicing and Target Specific snRNP Proteins ». *Molecular Cell* 23 (6):819-29. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.07.022.

Shivakoti, Rupak, Martina Siwek, Debra Hauer, Kimberly L. W. Schultz, et Diane E. Griffin. 2013. « Induction of Dendritic Cell Production of Type I and Type III Interferons by Wild-Type and Vaccine Strains of Measles Virus: Role of Defective Interfering RNAs ». *Journal of Virology* 87 (14):7816-27. https://doi.org/10.1128/JVI.00261-13.

Shultz, David B., John D. Fuller, Yonghui Yang, Nywana Sizemore, M. R. Sandhya Rani, et George R. Stark. 2007. « Activation of a Subset of Genes by IFN-Gamma Requires IKKbeta but Not Interferon-Dependent Activation of NF-kappaB ». *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 27 (10):875-84. https://doi.org/10.1089/jir.2007.0031.

Sleat, D E, et A K Banerjee. 1993. « Transcriptional activity and mutational analysis of recombinant vesicular stomatitis virus RNA polymerase. » *Journal of Virology* 67 (3):1334-39.

Sleeman, Katrina, Bettina Bankamp, Kimberly B. Hummel, Michael K. Lo, William J. Bellini, et Paul A. Rota. 2008. « The C, V and W proteins of Nipah virus inhibit minigenome

replication ». *Journal of General Virology* 89 (5):1300-1308. https://doi.org/10.1099/vir.0.83582-0.

Smale, Stephen T. 2012. « Dimer-Specific Regulatory Mechanisms within the NF-κB Family of Transcription Factors ». *Immunological Reviews* 246 (1):193-204. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01091.x.

Smallwood, Sherin, Colin D. Easson, Joyce A. Feller, Sandra M. Horikami, et Sue A. Moyer. 1999. « Mutations in Conserved Domain II of the Large (L) Subunit of the Sendai Virus RNA Polymerase Abolish RNA Synthesis ». *Virology* 262 (2):375-83. https://doi.org/10.1006/viro.1999.9933.

Sohayati, A. R., L. Hassan, S. H. Sharifah, K. Lazarus, C. M. Zaini, J. H. Epstein, N. Shamsyul Naim, et al. 2011. « Evidence for Nipah Virus Recrudescence and Serological Patterns of Captive Pteropus Vampyrus ». *Epidemiology and Infection* 139 (10):1570. https://doi.org/10.1017/S0950268811000550.

Stewart, Cameron R., Glenn A. Marsh, Kristie A. Jenkins, Michael P. Gantier, Mark L. Tizard, Deborah Middleton, John W. Lowenthal, et al. 2013. « Promotion of Hendra Virus Replication by microRNA 146a ». *Journal of Virology* 87 (7):3782-91. https://doi.org/10.1128/JVI.01342-12.

Sugai, Akihiro, Hiroki Sato, Ikuyo Takayama, Misako Yoneda, et Chieko Kai. 2017. « Nipah and Hendra Virus Nucleoproteins Inhibit Nuclear Accumulation of STAT1 and STAT2 by Interfering with Their Complex Formation ». *Journal of Virology*, août. https://doi.org/10.1128/JVI.01136-17.

Sultana, H., D. W. Seo, M. S. A. Bhuiyan, N. R. Choi, M. R. Hoque, K. N. Heo, et J. H. Lee. 2016. « Genetic Diversity and Phylogenetic Analysis of South-East Asian Duck Populations Based on the mtDNA D-loop Sequences ». *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 29 (12):1688-95. https://doi.org/10.5713/ajas.15.1017.

Sun, Shao-Cong. 2011. « Non-Canonical NF-κB Signaling Pathway ». *Cell Research* 21 (1):71-85. https://doi.org/10.1038/cr.2010.177.

Swanson, J. A., et P. L. McNeil. 1987. « Nuclear Reassembly Excludes Large Macromolecules ». *Science (New York, N.Y.)* 238 (4826):548-50.

Sweileh, Waleed M. 2017. « Global research trends of World Health Organization's top eight emerging pathogens ». *Globalization and Health* 13 (février). https://doi.org/10.1186/s12992-017-0233-9.

Sziszkosz, Nikolett, Sándor Mihók, András Jávor, et Szilvia Kusza. 2016. « Genetic Diversity of the Hungarian Gidran Horse in Two Mitochondrial DNA Markers ». *PeerJ* 4:e1894. https://doi.org/10.7717/peerj.1894.

Tan, Chong Tin, Khean Jin Goh, Kum Thong Wong, Sazilah Ahmad Sarji, Kaw Bing Chua, Nee Kong Chew, Paramsothy Murugasu, et al. 2002. « Relapsed and Late-Onset Nipah Encephalitis ». *Annals of Neurology* 51 (6):703-8. https://doi.org/10.1002/ana.10212.

Tanimura, N., T. Imada, Y. Kashiwazaki, et S. H. Sharifah. 2006. « Distribution of Viral Antigens and Development of Lesions in Chicken Embryos Inoculated with Nipah Virus ». *Journal of Comparative Pathology* 135 (2-3):74-82. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.05.001.

Tegethoff, Sebastian, Joachim Behlke, et Claus Scheidereit. 2003. « Tetrameric Oligomerization of IkappaB Kinase Gamma (IKKgamma) Is Obligatory for IKK Complex Activity and NF-kappaB Activation ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (6):2029-41.

Terme, Jean-Michel, Melanie Wencker, Arnaud Favre-Bonvin, Françoise Bex, Louis Gazzolo, Madeleine Duc Dodon, et Pierre Jalinot. 2008. « Cross Talk between Expression of the

Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Transactivator and the Oncogenic bHLH Transcription Factor TAL1 ». *Journal of Virology* 82 (16):7913-22. https://doi.org/10.1128/JVI.02414-07.

Torres-Velez, F. J., W.-J. Shieh, P. E. Rollin, T. Morken, C. Brown, T. G. Ksiazek, et S. R. Zaki. 2008. « Histopathologic and Immunohistochemical Characterization of Nipah Virus Infection in the Guinea Pig ». *Veterinary Pathology* 45 (4):576-85. https://doi.org/10.1354/vp.45-4-576.

Uchikawa, Emiko, Mathilde Lethier, Hélène Malet, Joanna Brunel, Denis Gerlier, et Stephen Cusack. 2016. « Structural Analysis of dsRNA Binding to Anti-viral Pattern Recognition Receptors LGP2 and MDA5 ». *Molecular Cell* 62 (4):586-602. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.021.

Urano-Tashiro, Yumiko, Hironobu Sasaki, Mioko Sugawara-Kawasaki, Takeyuki Yamada, Akinori Sugiyama, Hirotada Akiyama, Yasushi Kawasaki, et Fumio Tashiro. 2010. « Implication of Akt-Dependent Prp19 alpha/14-3-3beta/Cdc5L Complex Formation in Neuronal Differentiation ». *Journal of Neuroscience Research* 88 (13):2787-97. https://doi.org/10.1002/jnr.22455.

« USC MLEG Group: Research ». s. d. Consulté le 9 juillet 2017. http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/.

Varble, Andrew J., Christopher D. Ried, Warren J. Hammond, Kaitlin A. Marquis, Matthew C. Woodruff, et Maureen C. Ferran. 2016. « The Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Inhibits NF-κB Activation in Mouse L929 Cells ». *Virology* 499 (décembre):99-104. https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.09.009.

Vigant, Frederic, et Benhur Lee. 2011. « Hendra and Nipah Infection: Pathology, Models and Potential Therapies ». *Infectious Disorders Drug Targets* 11 (3):315.

Vijayan, Madhuvanthi, Young-Jin Seo, Curtis John Pritzl, Sarah Angela Squires, Stephen Alexander, et Bumsuk Hahm. 2014. « Sphingosine Kinase 1 Regulates Measles Virus Replication ». *Virology* 0 (février):55. https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.039.

Virtue, Elena R., Glenn A. Marsh, Michelle L. Baker, et Lin-Fa Wang. 2011. « Interferon Production and Signaling Pathways Are Antagonized during Henipavirus Infection of Fruit Bat Cell Lines ». *PLoS ONE* 6 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022488.

Virtue, Elena R., Glenn A. Marsh, et Lin-Fa Wang. 2011. « Interferon Signaling Remains Functional during Henipavirus Infection of Human Cell Lines ». *Journal of Virology* 85 (8):4031. https://doi.org/10.1128/JVI.02412-10.

Wacharapluesadee, Supaporn, Boonlert Lumlertdacha, Kalyanee Boongird, Sawai Wanghongsa, Lawan Chanhome, Pierre Rollin, Patrick Stockton, Charles E. Rupprecht, Thomas G. Ksiazek, et Thiravat Hemachudha. 2005. « Bat Nipah Virus, Thailand ». *Emerging Infectious Diseases* 11 (12):1949. https://doi.org/10.3201/eid1112.050613.

Wang, L. F., W. P. Michalski, M. Yu, L. I. Pritchard, G. Crameri, B. Shiell, et B. T. Eaton. 1998. « A Novel P/V/C Gene in a New Member of the Paramyxoviridae Family, Which Causes Lethal Infection in Humans, Horses, and Other Animals ». *Journal of Virology* 72 (2):1482-90.

Wang, Penghua, Long Yang, Gong Cheng, Guang Yang, Zhengyun Xu, Fuping You, Qiang Sun, Rongtuan Lin, Erol Fikrig, et Richard E. Sutton. 2013. « UBXN1 Interferes with Rig-I-like Receptor-Mediated Antiviral Immune Response by Targeting MAVS ». *Cell Reports* 3 (4):1057-70. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.027.

Wang, Yao E., Arnold Park, Michael Lake, Mickey Pentecost, Betsabe Torres, Tatyana E. Yun, Mike C. Wolf, Michael R. Holbrook, Alexander N. Freiberg, et Benhur Lee. 2010.

« Ubiquitin-Regulated Nuclear-Cytoplasmic Trafficking of the Nipah Virus Matrix Protein Is Important for Viral Budding ». *PLoS Pathogens* 6 (11):e1001186. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001186.

Wang, Yu-Bo, Bo Tan, Rui Mu, Yan Chang, Min Wu, Hai-Qing Tu, Yu-Cheng Zhang, et al. 2015. « Ubiquitin-associated Domain-containing Ubiquitin Regulatory X (UBX) Protein UBXN1 Is a Negative Regulator of Nuclear Factor κB (NF-κB) Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (16):10395-405. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.631689.

Watkinson, Ruth E., et Benhur Lee. 2016. « Nipah Virus Matrix Protein: Expert Hacker of Cellular Machines ». *FEBS Letters* 590 (15):2494-2511. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12272.

Weaver, Scott C., et Alan D. T. Barrett. 2004. « Transmission Cycles, Host Range, Evolution and Emergence of Arboviral Disease ». *Nature Reviews Microbiology* 2 (10):789-801. https://doi.org/10.1038/nrmicro1006.

Webster, Gill A., et Neil D. Perkins. 1999. « Transcriptional Cross Talk between NF-κB and p53 ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (5):3485-95.

Weingartl, Hana M., Yohannes Berhane, Jeff L. Caswell, Sheena Loosmore, Jean-Christophe Audonnet, James A. Roth, et Markus Czub. 2006. « Recombinant Nipah Virus Vaccines Protect Pigs against Challenge ». *Journal of Virology* 80 (16):7929. https://doi.org/10.1128/JVI.00263-06.

Weis, Michael, et Andrea Maisner. 2015. « Nipah Virus Fusion Protein: Importance of the Cytoplasmic Tail for Endosomal Trafficking and Bioactivity ». *European Journal of Cell Biology* 94 (7-9):316-22. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.05.005.

Wickremasinghe, Melissa I., Lynette H. Thomas, Cecilia M. O'Kane, Jasim Uddin, et Jon S. Friedland. 2004. « Transcriptional Mechanisms Regulating Alveolar Epithelial Cell-Specific CCL5 Secretion in Pulmonary Tuberculosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (26):27199-210. https://doi.org/10.1074/jbc.M403107200.

Williamson, M. M., P. T. Hooper, P. W. Selleck, H. A. Westbury, et R. F. Slocombe. 2000. « Experimental Hendra Virus Infectionin Pregnant Guinea-pigs and Fruit Bats(Pteropus poliocephalus) ». *Journal of Comparative Pathology* 122 (2):201-7. https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0364.

Wong, Kum Thong, Wun-Ju Shieh, Shalini Kumar, Karim Norain, Wahidah Abdullah, Jeannette Guarner, Cynthia S. Goldsmith, et al. 2002. « Nipah Virus Infection: Pathology and Pathogenesis of an Emerging Paramyxoviral Zoonosis ». *The American Journal of Pathology* 161 (6):2153-67. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64493-8.

Wu, Zhiqiang, Li Yang, Fan Yang, Xianwen Ren, Jinyong Jiang, Jie Dong, Lilian Sun, Yafang Zhu, Hongning Zhou, et Qi Jin. 2014. « Novel Henipa-like Virus, Mojiang Paramyxovirus, in Rats, China, 2012 ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (6):1064. https://doi.org/10.3201/eid2006.131022.

Xing, Liyu, et Daniel G. Remick. 2007. « Promoter Elements Responsible for Antioxidant Regulation of MCP-1 Gene Expression ». *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (11):1979-89. https://doi.org/10.1089/ars.2007.1921.

Xu, Kai, Christopher C. Broder, et Dimitar B. Nikolov. 2012. « Ephrin-B2 and Ephrin-B3 as Functional Henipavirus Receptors ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23 (1):116-23. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.12.005.

Xu, Pei, Zhuo Li, Dengyun Sun, Yuan Lin, Jianguo Wu, Paul A. Rota, et Biao He. 2011. « Rescue of Wild-Type Mumps Virus from a Strain Associated with Recent Outbreaks Helps to

Define the Role of the SH ORF in the Pathogenesis of Mumps Virus ». *Virology* 417 (1):126-36. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.05.003.

Yabukarski, Filip, Philip Lawrence, Nicolas Tarbouriech, Jean-Marie Bourhis, Elise Delaforge, Malene Ringkjøbing Jensen, Rob W. H. Ruigrok, Martin Blackledge, Viktor Volchkov, et Marc Jamin. 2014. « Structure of Nipah Virus Unassembled Nucleoprotein in Complex with Its Viral Chaperone ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (9):754-59. https://doi.org/10.1038/nsmb.2868.

Yadav, Pragya D., Chandrashekhar G. Raut, Anita M. Shete, Akhilesh C. Mishra, Jonathan S. Towner, Stuart T. Nichol, et Devendra T. Mourya. 2012. « Detection of Nipah Virus RNA in Fruit Bat (Pteropus Giganteus) from India ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87 (3):576. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0416.

Yaffe, Michael B. 2002. « How Do 14-3-3 Proteins Work?-- Gatekeeper Phosphorylation and the Molecular Anvil Hypothesis ». *FEBS Letters* 513 (1):53-57.

Yamaguchi, Mayu, Yoshinori Kitagawa, Min Zhou, Masae Itoh, et Bin Gotoh. 2014. « An Anti-Interferon Activity Shared by Paramyxovirus C Proteins: Inhibition of Toll-like Receptor 7/9-Dependent Alpha Interferon Induction ». *FEBS Letters* 588 (1):28-34. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.015.

Yang, Heng-Yin, Yu-Ye Wen, Chih-Hsin Chen, Guillermina Lozano, et Mong-Hong Lee. 2003. « 14-3-3 Sigma Positively Regulates p53 and Suppresses Tumor Growth ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (20):7096-7107.

Yob, Johara Mohd, Hume Field, Azmin Mohd Rashdi, Christopher Morrissy, Brenda van der Heide, Paul Rota, Azri bin Adzhar, et al. 2001. « Nipah Virus Infection in Bats (Order Chiroptera) in Peninsular Malaysia ». *Emerging Infectious Diseases* 7 (3):439-41. https://doi.org/10.3201/eid0703.010312.

Yoboua, Fabrice, Alexis Martel, Annick Duval, Espérance Mukawera, et Nathalie Grandvaux. 2010. « Respiratory Syncytial Virus-Mediated NF-Kappa B p65 Phosphorylation at Serine 536 Is Dependent on RIG-I, TRAF6, and IKK Beta ». *Journal of Virology* 84 (14):7267-77. https://doi.org/10.1128/JVI.00142-10.

Yoneda, Misako, Vanessa Guillaume, Fusako Ikeda, Yuki Sakuma, Hiroki Sato, T. Fabian Wild, et Chieko Kai. 2006. « Establishment of a Nipah Virus Rescue System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (44):16508. https://doi.org/10.1073/pnas.0606972103.

Yoneda, Misako, Vanessa Guillaume, Hiroki Sato, Kentaro Fujita, Marie-Claude Georges-Courbot, Fusako Ikeda, Mio Omi, Yuri Muto-Terao, T. Fabian Wild, et Chieko Kai. 2010. « The Nonstructural Proteins of Nipah Virus Play a Key Role in Pathogenicity in Experimentally Infected Animals ». *PLoS ONE* 5 (9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012709.

Zhang, Guojie, Christopher Cowled, Zhengli Shi, Zhiyong Huang, Kimberly A. Bishop-Lilly, Xiaodong Fang, James W. Wynne, et al. 2013. « Comparative Analysis of Bat Genomes Provides Insight into the Evolution of Flight and Immunity ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6118):456-60. https://doi.org/10.1126/science.1230835.

Zhang, Qian, Michael J. Lenardo, et David Baltimore. 2017. « 30 Years of NF-κB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology ». *Cell* 168 (1-2):37-57. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012.

Zhang, Shen-Ying, Emmanuelle Jouanguy, Vanessa Sancho-Shimizu, Horst Von Bernuth, Kun Yang, Laurent Abel, Capucine Picard, Anne Puel, et Jean-Laurent Casanova. 2007. « Human Toll-like Receptor-Dependent Induction of Interferons in Protective

Immunity to Viruses ». *Immunological Reviews* 220 (1):225-36. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00564.x.

Zhou, Peng, Mary Tachedjian, James W. Wynne, Victoria Boyd, Jie Cui, Ina Smith, Christopher Cowled, et al. 2016. « Contraction of the Type I IFN Locus and Unusual Constitutive Expression of IFN-α in Bats ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (10):2696. https://doi.org/10.1073/pnas.1518240113.