

***ETUDE DE LA CAPACITE DE L'ORF1 DU HEV A MODULER LE SYSTEME
IFN-I***

I- INTRODUCTION

Un grand nombre de virus ont mis en place des stratégies pour inhiber les voies de synthèse de l'IFN-I et de réponse à l'IFN-I. En contexte infectieux, le HEV est capable d'inhiber l'expression de certains ISGs. En contexte de surexpression, il a été rapporté un rôle de l'ORF2 et de l'ORF3 du HEV dans l'inhibition des voies d'induction et de réponse à l'IFN-I. Cependant, peu d'études ont encore été réalisées sur l'ORF1 du HEV.

L'ORF1 du HEV code pour une polyprotéine possédant les fonctions non-structurales. Cependant, les fonctions de certains domaines de l'ORF1 ne sont pas encore très bien comprises, et notamment l'effet des différents domaines de l'ORF1 sur les voies de signalisation de l'IFN-I. Les domaines PCP et X sont homologues à d'autres motifs viraux pour lesquels un rôle dans la modulation du système IFN-I a été démontré. L'objectif de cette partie de mon projet de thèse était donc de déterminer si l'ORF1 ou ses différents domaines ont un effet sur l'activation des voies de signalisation de l'IFN-I. Nous avons alors cloné et exprimé les différents domaines de l'ORF1 pour tester leurs capacités à moduler la voie de réponse à l'IFN-I, puis nous avons sélectionné le domaine protéique au plus fort potentiel inhibiteur afin d'étudier son mécanisme d'action au sein de la voie de signalisation.

II- MATERIELS ET METHODES

A- Plasmides

1- Stratégie de clonage de l'ORF1 et de ces différents domaines

Les séquences codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines putatifs ont été déterminées par bioinformatique en utilisant des logiciels de prédiction de domaines fonctionnels⁹⁹. Ces séquences ont été amplifiées par PCR en utilisant la polymérase Phusion (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific ; Waltham, Massachusetts, États-Unis) avec les oligonucléotides répertoriés dans l'annexe 1. Un clone infectieux construit dans le laboratoire et codant pour le génome complet d'un génotype 3f du HEV (FR-FulmHEV-3f amplifié à partir du sérum d'un

patient présentant une hépatite E fulminante) a été utilisé comme matrice pour l'amplification des différents domaines de l'ORF1 du HEV-3.

La technique de clonage Gateway (Invitrogen; Carlsbad, CA, Etats-Unis) nécessite l'incorporation des sites de recombinaison AttB1 et AttB2 aux extrémités du produit de PCR à cloner. Ils sont utilisés pour l'insertion du produit de PCR dans un vecteur d'entrée Gateway compatible (pDONOR207R, Invitrogen ; Carlsbad, CA, Etats-Unis) via un processus de recombinaison homologue durant une réaction BP (Invitrogen; Carlsbad, CA, Etats-Unis) effectuée en suivant les instructions du fabricant. Le gène cloné peut ensuite être redistribué par une deuxième réaction de recombinaison dans une collection de vecteurs de destination Gateway compatibles (pCINeo3xFlag et pEGFP-C1) par une simple réaction LR (Invitrogen; Carlsbad, CA, Etats-Unis) effectuée en suivant les instructions du fabricant. Toutes les constructions réalisées ont été séquencées (Eurofins MWG, Ebersberg, Allemagne).

2- *Autres plasmides*

Les plasmides p Δ RIG-I comprenant les domaines CARD de la protéine RIG-I, activateurs constitutifs de la voie IFN- β , fusionnés à une étiquette FLAG⁵⁵⁹ et pRSV- β gal codant pour le gène de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous proviennent du laboratoire d'Eliane Meurs (Institut Pasteur). Les plasmides pCINeo3Flag-NS3 codant la protéine NS3 du BTV8 associée à une étiquette 3FLAG à son extrémité N-terminale⁵⁶⁰ ont tous été fournis par Damien Vitour (ANSES, Laboratoire de santé animale). Le plasmide pCR3.1-SOCS3 codant pour la protéine SOCS3⁵⁶¹ a été fourni par Christoph Auernhammer (Université Ludwig-Maximilians-Universität). Le plasmide pISRE composé du gène codant pour la luciférase *firefly* sous le contrôle du promoteur ISRE, pIFN- β composé du gène codant pour la luciférase *firefly* sous le contrôle du promoteur IFN- β et pCINeo3xFlag-V⁵²³ codant pour la protéine V du MV associée à une étiquette 3FLAG à son extrémité N-terminale ont été fournis par Yves Jacob (Université Paris Descartes).

B- Cellules

1- Culture cellulaire

Les cellules épithéliales humaines de rein HEK293T (293T) et les cellules humaines HeLa provenant d'un cancer du col de l'utérus ont été cultivées dans du milieu DMEM+GlutaMAX (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; Gibco, Gaithersburg, MD, États-Unis) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100UI/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine (P/S) et 1% de pyruvate (Gibco, Gaithersburg, MD, États-Unis) à 37°C et 5% CO₂. Les cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 ont été cultivées dans le même milieu et sérum, supplémenté avec 1% d'acides aminés non essentiels (NEAA ; Gibco, Gaithersburg, MD, États-Unis).

2- Transfections

Les transfections de plasmides dans des cellules 293T, A549 et HeLa ont été réalisées en utilisant le réactif JetPRIME (Polyplus transfection, Strasbourg, France) selon les instructions du fabricant.

3- Stimulation des cellules à l'IFN

L'IFN-β humain utilisé pour activer la voie JAK-STAT provient de PBL (Piscataway, NJ, États-Unis). L'IFN-γ humain provient de chez PeproTech (Rocky Hill, NJ, États-Unis).

Les cellules 293T transfectées ont été stimulées avec 500UI/ml d'IFN-β pour les expériences d'immunoblot ou 1000UI/ml d'IFN-β pour les expériences d'immunofluorescence et pour les tests rapporteurs luciférase. La stimulation a été effectuée en retirant le milieu et ajoutant un nouveau milieu dans lequel l'IFN-β est dilué. La stimulation est réalisée pendant 30 minutes pour analyser l'état de phosphorylation des protéines de la voie JAK-STAT et la translocation de STAT1 dans le noyau, pendant 6h pour étudier l'expression des ISGs ou pendant 7h pour étudier l'activité du promoteur IFN-β. A la fin de la stimulation, les cellules sont soit récoltées pour l'extraction des ARNs ou des protéines, soit fixées pour analyse par immunofluorescence (IF). Pour la stimulation à l'IFN-γ, les cellules 293T ont été traitées

pendant 30 minutes avec 250ng/ μ l d'IFN- γ en diluant l'IFN dans du milieu de culture. 30 minutes plus tard, les cellules ont été récoltées pour extraction des protéines.

C- Analyse de la viabilité cellulaire

Des cellules 293T ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24h avant la transfection (7.5×10^4 cellules/puits). Après 24h ou 40h de transfection, les cellules ont été lysées et la viabilité cellulaire a été analysée en utilisant le kit CellTiter-Glo™ (Promega ; Madison, WI, États-Unis) suivant les instructions du fabricant. Ce kit est basé sur la quantification de l'ATP (Adenosine triphosphate) présent dans les cellules, qui signale la présence de cellules métaboliquement actives.

D- Tests rapporteurs luciférase

Les tests rapporteurs luciférase ont été effectués dans des cellules 293Tensemencées 24h à l'avance dans des plaques 24 puits (0.4×10^6 cellules/puits). Afin d'analyser l'effet des différents domaines sur l'activité du promoteur ISRE, les cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour la luciférase *Firefly* sous le contrôle du promoteur ISRE (pISRE ; 100ng/puits), le plasmide pRSV- β gal exprimant le gène de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous (50ng) et les plasmides codant pour l'ORF1 ou les différents domaines ou le vecteur vide pCINeo comme contrôle négatif ou un plasmide codant pour la protéine SOCS3 cellulaire comme contrôle positif. Après 18h de transfection, les cellules ont été traitées avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 7h. Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon composé de 25mM Tris pH 7.8, 8mM MgCl₂, 0.1% Triton 100X et 15% de glycérol afin de mesurer l'activité luciférase et β -galactosidase. L'activité luciférase *Firefly* a été mesurée après avoir mélangé 50 μ l de lysat avec 50 μ l de réactif Bright-Glo (Promega; Madison, WI, États-Unis) à l'aide d'un luminomètre (EnSpire® Alpha ; Perkin Elmer, Wellesley, MA, États-Unis). L'activité β -galactosidase a été dosée par un test colorimétrique en ajoutant 50 μ l d'un tampon substrat (composé de 200mM de Na₂HPO₄ pH 7.3, 2mM de MgCl₂, 100mM de β -mercaptoéthanol et 1.33mg/ml d'ONPG (pour ortho-nitrophényl- β -galactoside)) à 50 μ l de lysat. La réaction a été quantifiée à l'aide d'un lecteur de plaque à une longueur d'onde de 450 nm (MultiSkan EX, Thermo, Waltham, MA, États-

Unis). La moyenne du ratio de l'activité luciférase sur l'activité β -galactosidase de triplicats a été calculée pour obtenir l'activité luciférase normalisée pour chaque condition testée.

E- Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq)

L'ARN total a été extrait des culots cellulaires en utilisant le kit RNeasy (Qiagen ; Hilden, Allemagne) en incluant une étape de digestion à la DNase I sur colonne (Qiagen ; Hilden, Allemagne). Une deuxième étape de digestion à la TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA, États-Unis) a ensuite été réalisée, suivie d'une étape de lavage de l'ARN sur colonne avec le kit RNeasy (Qiagen ; Hilden, Allemagne). La transcription inverse (RT) a ensuite été réalisée avec 500ng d'ARN en utilisant l'enzyme PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio Inc. Shiga, Japon) selon les instructions du fabricant. La PCR en temps réel a été réalisée sur 2 μ l d'ADNc en utilisant le kit SYBR Green Master Mix (Roche, Bâle, Suisse) avec des oligonucléotides spécifiques, décrit dans l'annexe 1. Les échantillons d'ADNc ont été dénaturés durant 15 min à 95°C, puis les séquences ciblées ont été amplifiées pendant 40 cycles de 30s à 95°C, 30s à 60°C et 30s à 72°C suivi d'une étape de refroidissement à 40°C pendant 30s en utilisant l'appareil LightCycler 96 (Roche, Bâle, Suisse). La quantification relative a été réalisée par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁵⁶², le témoin cellulaire non stimulé ayant servi de calibrateur. L'ARNm de la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) a été utilisée comme contrôle endogène.

F- Analyse par Immunoblot

Les cellules 293T ont été lysées dans du tampon RIPA (composé de 25mM TrisHCl pH 8.8, 50mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (respectivement Complete et PhosSTOP, Roche, Bâle, Suisse)) à 4°C pendant 30 minutes. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 18 000 g pendant 15 minutes à 4°C et la concentration protéique du lysat cellulaire a été mesurée en utilisant le kit MicroBCA Protein assay (Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA, États-Unis) selon les instructions du fabricant. Des quantités équivalentes de protéines ont été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes dans un tampon Laemmli (BioRad ;

Hercules, CA, Etats-Unis) supplémenté avec 10% de β -mercaptoéthanol puis séparés sur gel de dodecyl sulphate-polyacrylamide à 10 ou 12% (SDS-PAGE).

Après séparation par SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Proton Premium 0.45 μ M NC ; GE healthcare LifeScience, Pittsburgh, PA, Etats-Unis) en condition de transfert semi-liquide à 25V pendant 25 minutes ou liquide à 160mA pendant 1h30. Ensuite, afin d'éviter les interactions non spécifiques, une étape de blocage de la membrane est réalisée soit dans du PBS (pour *phosphate-buffered saline*) contenant 5% de lait et 0.05% de Tween-20 soit dans du TBS (pour *tris-buffered saline*) contenant 5% de BSA (pour *Bovine serum albumine*) et 0.05% de Tween-20 pendant 1h à température ambiante (TA). Chaque membrane a ensuite été incubée avec des anticorps primaires spécifiques (Tableau 1) dilués dans le tampon de blocage pendant 1h à TA ou durant la nuit à 4°C. Après lavage, la membrane a été incubée pendant 1h à TA avec un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase) dans du tampon de blocage (Dako, Glostrup, Danmark, dilution 1/5000). Les protéines ont été détectées par l'ajout du substrat ECL (pour enhanced chemiluminescence ; composé de 1.25mM de Luminol (Sigma ; Saint-Louis, Missouri, États-Unis), 0.4mM d'acide p-Coumaric (Sigma ; Saint-Louis, MO, États-Unis) et 100mM de Tris pH 8.8 et 0.025% H₂O₂) et un système de détection Fusion Fx7 (Vilber Lourmat ; Marne-la-Vallée ; France). L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution	Blocage
Actine	Souris	Sigma-Aldrich (clone AC-40)	1/2500 ^{ème}	PBS-Lait
FLAG	Souris	Sigma-Aldrich (clone M2)	1/5000 ^{ème}	PBS-Lait
JAK1	Lapin	Cell signaling (6G4, 3344)	1/500 ^{ème}	TBS-BSA
PhJAK1 (Tyr1022/1023)	Lapin	Merck Millipore (07-1489)	1/500 ^{ème}	TBS-BSA
PhSTAT1 (Tyr701)	Lapin	Merck Millipore (07-307)	1/500 ^{ème}	PBS-Lait
PhSTAT2 (Tyr689)	Lapin	Merck Millipore (07-224)	1/500 ^{ème}	PBS-Lait
STAT1	Lapin	Merk Milipore (06-501)	1/1000 ^{ème}	PBS-Lait
STAT2	Lapin	Santa Cruz Biotechnology (SC-476)	1/200 ^{ème}	PBS-Lait

Tableau 1. Liste des anticorps primaires utilisés dans les expériences d'immunoblot.

G- Immunofluorescence (IF)

Des cellules A549 (0.25×10^6 cellules/puits), HeLa (0.2×10^6 cellules/puits) ou 293T (0.35×10^6 cellules/puits) ont étéensemencées sur des lamelles de 12-mm de diamètre dans une plaque P24 le jour précédent la transfection ou l'infection. Après 24h de transfection, les cellules ont été fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 20 minutes à TA. Les cellules ont ensuite été incubées dans du PBS contenant 50mM de chlorure d'ammonium pendant 5 minutes et perméabilisées dans du PBS contenant 0.2% de Triton X-100 pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 minutes dans du PBS contenant 0.5% de BSA pour éviter les accrochages non spécifiques et ensuite incubées avec des anticorps monoclonaux pendant 1h à TA (Tableau 2). Après trois lavages au PBS, un anticorps secondaire anti-souris couplé au DyLight 488 (vert) et/ou un anticorps secondaire anti-lapin couplé au DyLight 550 (rouge) ont été ajoutés pendant 45 minutes à TA. Les lamelles ont ensuite été lavées trois fois dans du PBS, rincées à l'eau distillée et montées sur des lames dans du milieu de montage Mowiol 4-88 (composé de 1g/ml de Glycérol et 0.4g/ml de Mowiol 4-88) contenant du DAPI ou du Hoechst. Les images ont été acquises en utilisant un microscope inversé AxioObserver Z1 (Zeiss ; Oberkochen, Allemagne) et le logiciel Zen (Zeiss ; Oberkochen, Allemagne).

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution
FLAG	Souris	Sigma-Aldrich (clone M2)	1/1000 ^{ème}
Kinectine1	Lapin	Santa Cruz Biotechnology (clone H-190)	1/200 ^{ème}
STAT1	Lapin	Merk Milipore	1/300 ^{ème}
Syntaxine6	Lapin	Ozyme (C34B2)	1/50 ^{ème}

Tableau 2. Liste des anticorps primaires utilisés dans les expériences d'immunofluorescence.

Les anticorps secondaires DyLight 488 anti-souris et DyLight 550 anti-lapin ont été achetés chez Thermo Scientific (Waltham, MA, Etats-Unis) et ont été utilisés au 1/600^{ème}. Le 4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) utilisé provient de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, Etats-Unis).

H- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant des tests t de student avec correction de Welsh avec au moins 3 réplicats biologiques. Les valeurs-p ont été considérées comme significatives quand $p < 0.05$.

III- RESULTATS

A- Construction et expression de plasmides codant pour les différents domaines de l'ORF1

1- Expression des différents domaines de l'ORF1 du HEV-3 dans les cellules 293T

Afin d'étudier l'effet de l'ORF1 et de ses différents domaines sur le système IFN-I, nous avons tout d'abord cloné les séquences codant pour les différents domaines de l'ORF1 dans un vecteur d'expression pCINeo3Flag. Nous avons obtenus des vecteurs possédant une étiquette 3xFLAG à leur extrémité N-terminale codant pour l'ORF1 complète (pFLAG-ORF1), le domaine MetPCP (correspondant à la partie N-terminale de l'ORF1 comprenant les domaines Met, Y et PCP appelé pFLAG-MetPCP), le domaine Y (pFLAG-Y), le domaine PCP (pFLAG-PCP) et le macrodomaine X (pFLAG-X) (Figure 22A).

Afin d'évaluer l'expression des différents domaines, les plasmides construits ont été transfectés dans des cellules 293T (Figures 22 B et C). Comme le montre la figure 22B, tous les plasmides s'expriment dans les cellules 293T et les produits possèdent le poids moléculaire attendu à l'exception du domaine PCP. En effet, la bande correspondant au domaine PCP correspond à un poids moléculaire supérieur à 25 kDa alors que celui attendu est de 23 kDa. De plus, la présence d'autres bandes de tailles supérieures, à environ 35 kDa, 40 kDa et 50 kDa, suggère que la protéine pourrait subir des modifications post-traductionnelles. Enfin, l'ORF1 et le domaine MetPCP présentent, en plus de leur taille attendue, des bandes de taille inférieure, suggérant que la polyprotéine pourrait être clivée ou dégradée dans les cellules. La figure 22C permet de mieux visualiser les bandes de taille inférieure que l'on peut observer pour l'ORF1.

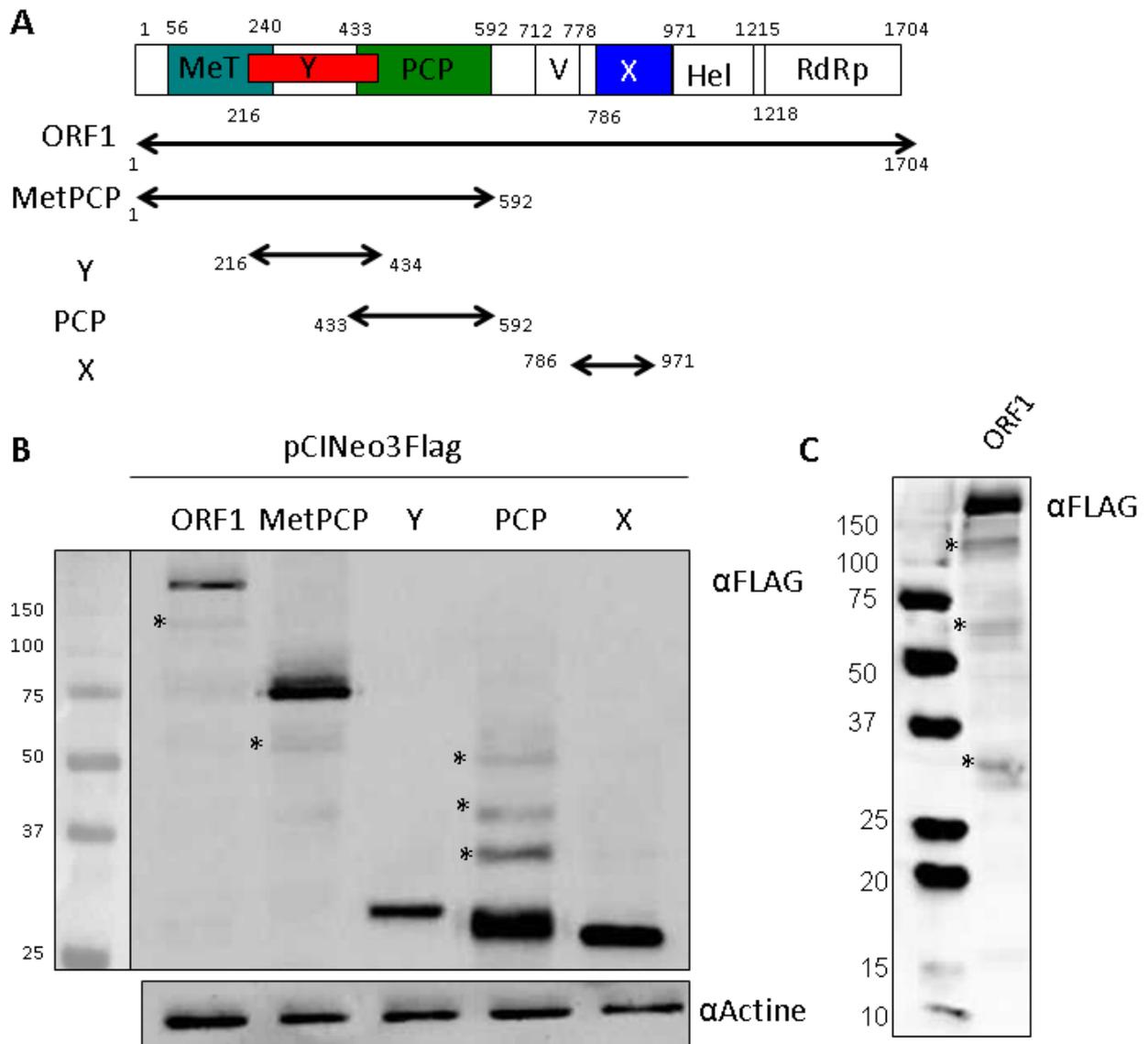


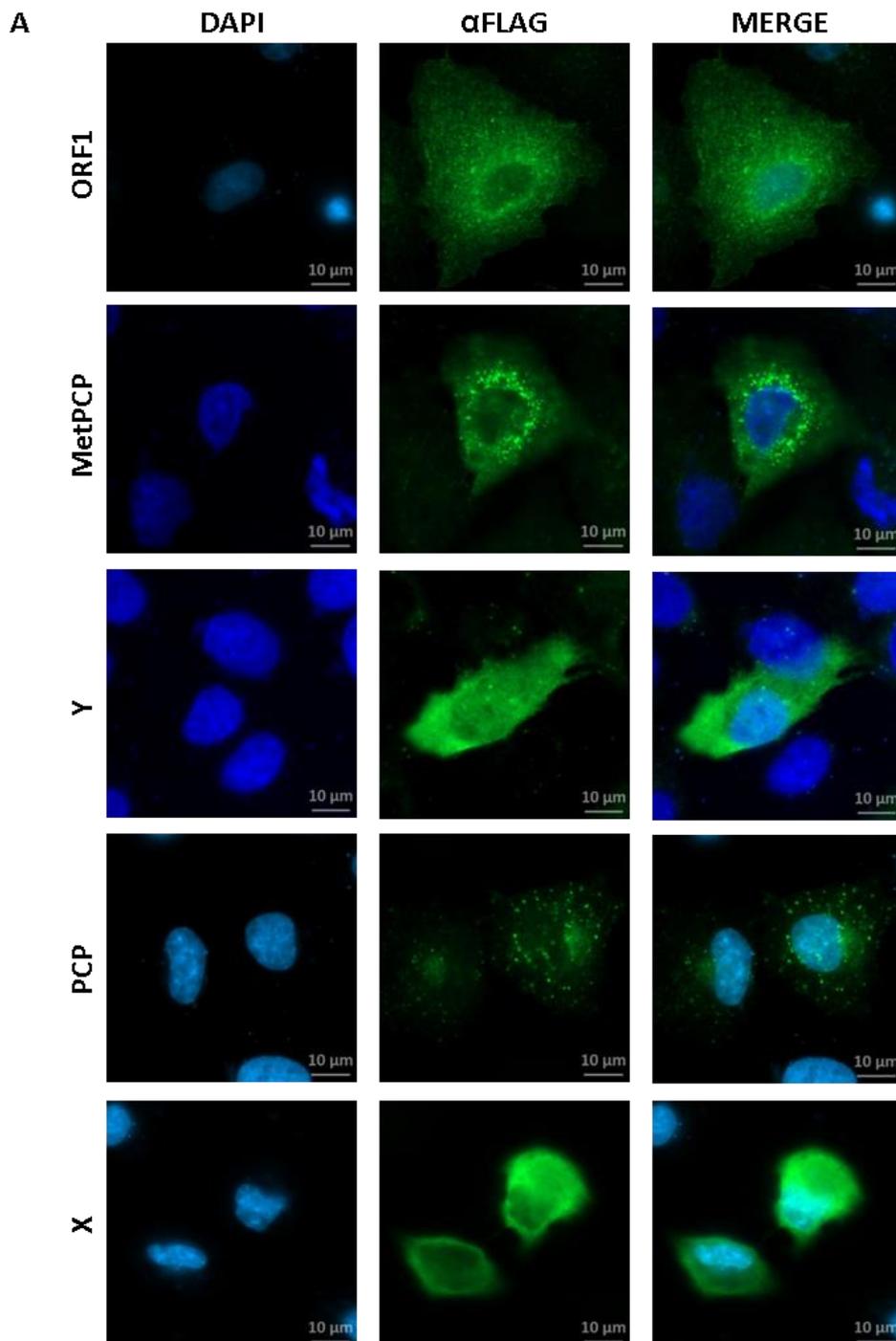
Figure 22. Construction de vecteurs d'expression codant pour l'ORF1 et ses différents domaines.

(A) Schéma de la polyprotéine ORF1 et des différentes constructions réalisées (ORF1, MetPCP, Y, PCP et X). Les nombres indiquent la position des acides aminés délimitant les domaines de l'ORF1 prédits ⁹⁹. **(B et C)** Les cellules 293T ont été transfectées avec les différents vecteurs d'expression construits. A 18h post-transfection, les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression de FLAG-ORF1 (192 kDa), FLAG-MetPCP (72 kDa), FLAG-Y (31 kDa), FLAG-PCP (23 kDa), FLAG-X (26 kDa) ou de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot.

2- Etude de la localisation sub-cellulaire de l'ORF1 et de ses différents domaines

Afin d'étudier la localisation subcellulaire de l'ORF1 et de ses différents domaines, les plasmides correspondant ont été transfectés dans des cellules A549, qui sont plus adaptées

à l'étude de la localisation de protéines par IF du fait qu'elles poussent en monocouche, adhèrent fermement aux lamelles et ont une plus grande taille comparée aux cellules 293T. Comme le montre la figure 23 A, l'ORF1 ainsi que les domaines MetPCP et PCP fusionnés à une étiquette FLAG présentent une localisation ponctiforme dans le cytoplasme des cellules. Au contraire, les domaines X et Y présentent une localisation diffuse. Cela suggère que l'ORF1 complète, le domaine MetPCP et le domaine PCP ont une localisation dans des compartiments cellulaires spécifiques de la cellule.



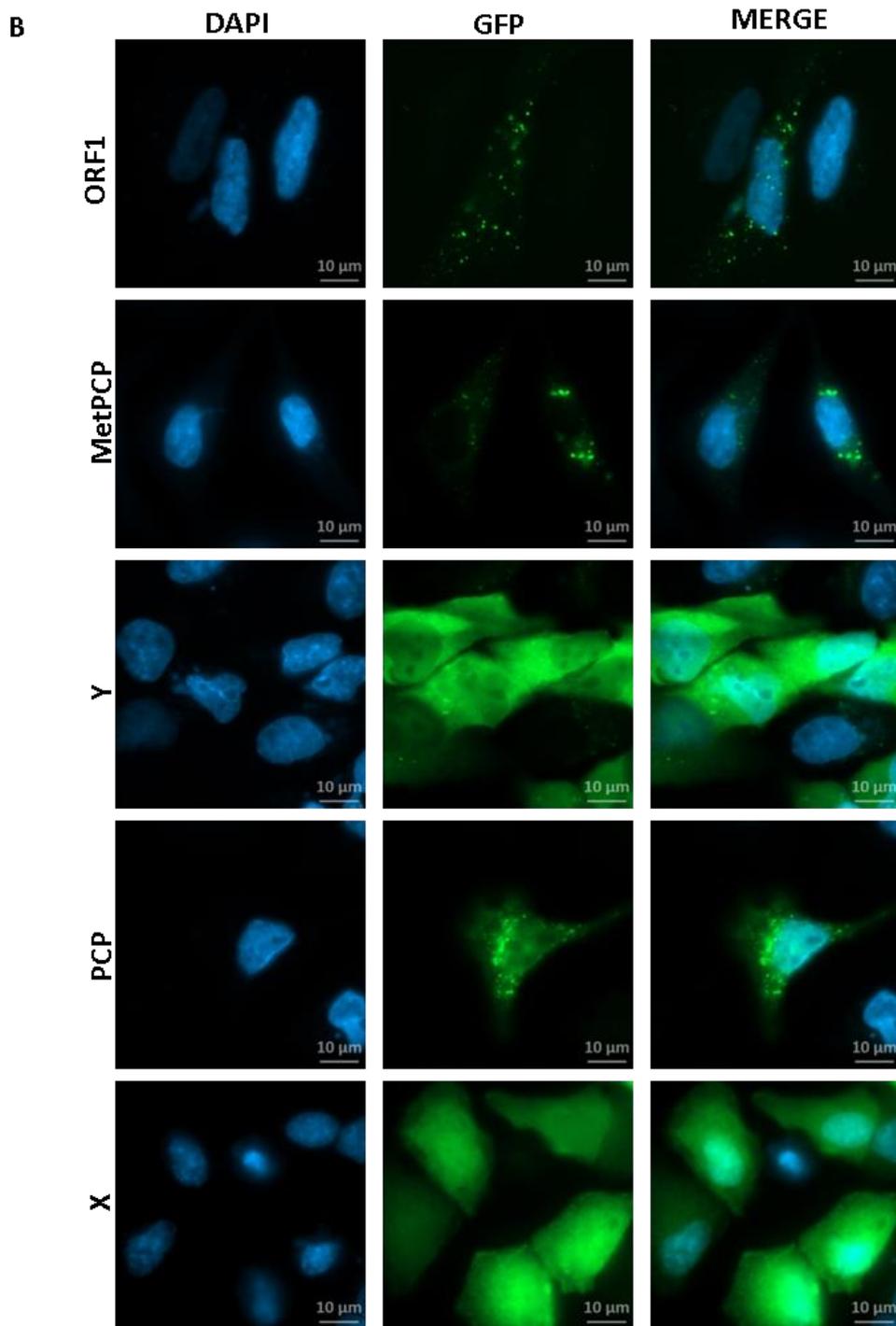


Figure 23. L'ORF1 et les domaines PCP et MetPCP présentent une localisation ponctiforme dans la cellule.

La localisation des protéines a été étudiée par microscopie à fluorescence. Les cellules A549 ont été transfectées avec 250ng de pFLAG-ORF1, pFLAG-MetPCP, pFLAG-Y, pFLAG-PCP, pFLAG-X (A) et pEGFP-ORF1, pEGFP-MetPCP, pEGFP-Y, pEGFP-PCP, pEGFP-X (B) pendant 8h. Après fixation, les cellules exprimant les différentes protéines ayant une étiquette FLAG ont été incubées avec un anticorps anti-FLAG de souris, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire conjugué à une molécule DyLight 488 (vert). Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630).

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les protéines présentant une étiquette FLAG, des vecteurs d'expression codant pour les différents domaines fusionnés à une étiquette eGFP (pour *enhanced green fluorescent protein*) à leur extrémité N-terminale ont été également générés. Nous avons obtenu des plasmides codant pour la protéine ORF1 complète (pEGFP-ORF1), le domaine MetPCP (pEGFP-MetPCP), le domaine Y (pEGFP-Y), le domaine PCP (pEGFP-PCP) et le domaine X (pEGFP-X). Comme le montre la figure 23B, l'ORF1 ainsi que ses différents domaines présentent la même localisation que celle observée avec les plasmides possédant une étiquette FLAG, confirmant ainsi les résultats de localisation subcellulaire précédemment obtenus.

Afin de déterminer plus précisément la localisation des domaines PCP et MetPCP dans la cellule, des expériences de co-marquage ont été réalisées dans des cellules HeLa, qui sont également de grandes cellules permettant d'étudier la localisation subcellulaire des protéines par IF. Elles permettent une meilleure expression des protéines par rapport aux cellules A549. Les co-marquages ont été réalisés en utilisant un anticorps anti-Kinectine pour marquer le RE et un anticorps anti-Syntaxine-6 pour marquer l'appareil de Golgi. Comme le montre la figure 24, le domaine MetPCP semble colocaliser avec la kinectine, suggérant que ce domaine est localisé dans le RE ou dans une structure proche. De plus, le domaine MetPCP entraîne un changement de localisation de la kinectine par rapport à sa localisation dans les cellules non transfectées (Figure 24A haut). Le domaine PCP semble également être localisé au niveau du RE sans entraîner de re-localisation de la kinectine (Figure 24A bas). Au contraire, aucun des domaines n'est localisé au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 24B).

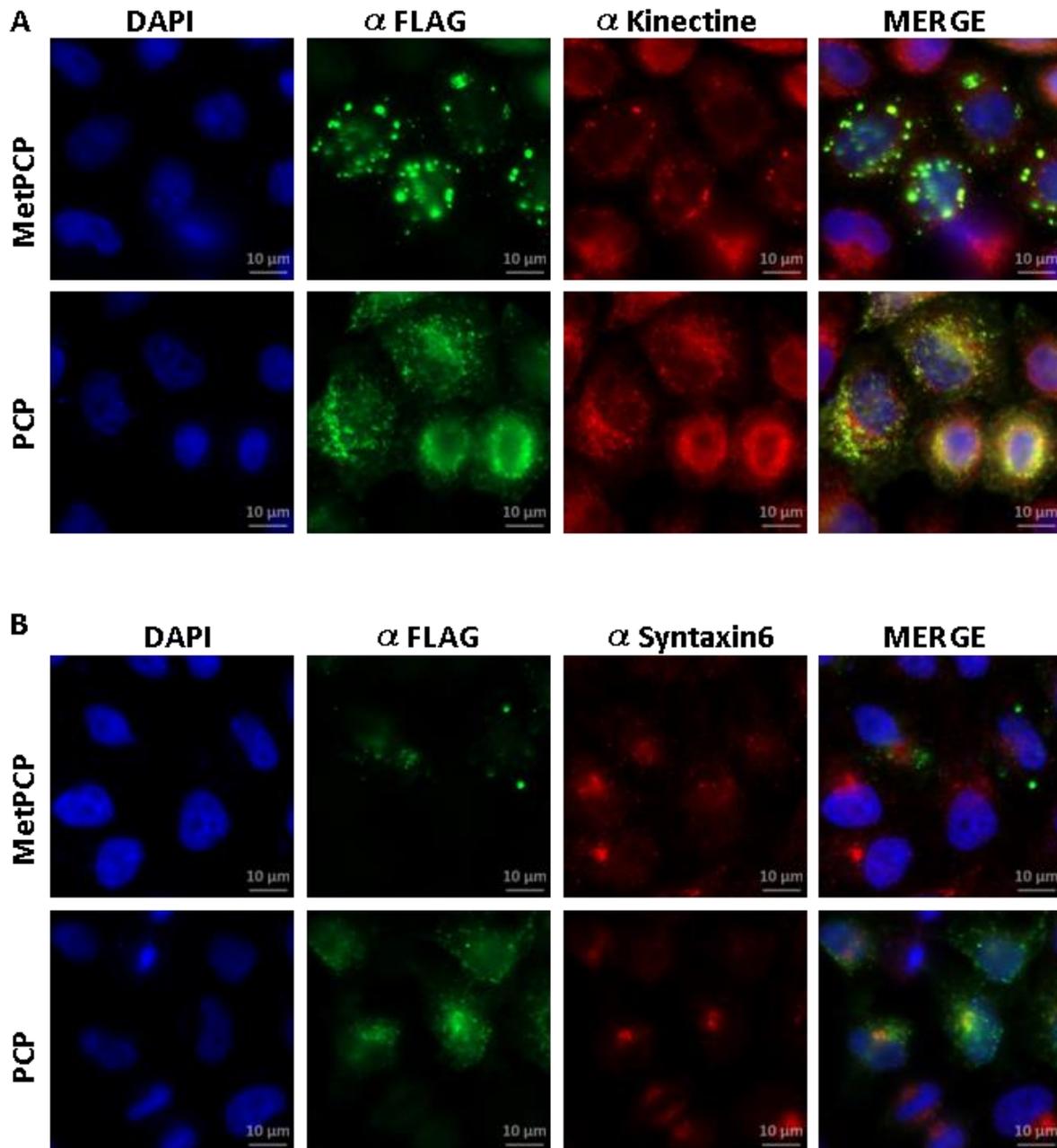


Figure 24. Les domaines PCP et MetPCP de l'ORF1 sont localisés au niveau du RE ou dans des structures proches.

La co-localisation des domaines de l'ORF1 avec des marqueurs cellulaires a été étudiée par microscopie à fluorescence. Des cellules HeLa ont été transfectées avec pFLAG-MetPCP et pFLAG-PCP (500ng) pendant 18h. Après fixation, les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-FLAG de souris et un anticorps anti-Kinectine de lapin **(A)** ou un anticorps anti-Syntaxine6 de lapin **(B)**, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire respectivement conjugué à une molécule DyLight 488 (vert) et DyLight 550 (rouge). Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630).

3- Etude de l'impact de l'expression de l'ORF1 et de ses différents domaines sur la viabilité cellulaire

Avant d'étudier l'impact de l'expression de l'ORF1 ou de ses différents domaines sur les voies de signalisation de l'IFN-I, nous avons souhaité vérifier si l'ORF1 ou ses différents domaines avaient un effet sur la viabilité cellulaire afin de ne pas induire de biais dans nos expériences. Dans ce but, des cellules 293T ont été transfectées avec les différents plasmides et la viabilité cellulaire a été analysée en utilisant le kit CellTiter-Glo™. Comme le montre la figure 25, ni l'expression de l'ORF1 ni celle des différents domaines n'a d'effet sur la viabilité cellulaire dans les cellules 293T.

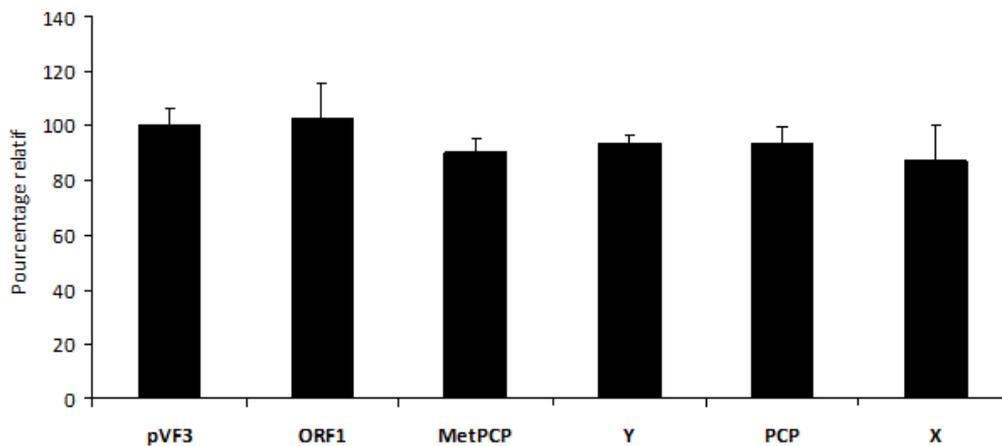


Figure 25. L'expression de l'ORF1 ou de ses différents domaines n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire.

Des cellules 293T ont été transfectées avec 100ng des plasmides codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines. Les cellules ont été lysées 24h post-transfection et la viabilité cellulaire a été étudiée en utilisant le kit CellTiter-Glo™. Les résultats sont représentés en pourcentage relatif par rapport au contrôle transfecté avec le vecteur vide pCINeo3Flag (pVF₃). L'expérience a été reproduite 2 fois indépendamment et les barres d'erreurs représentent les moyennes de triplicats d'une expérience.

B- Etude de la capacité de l'ORF1 du HEV à moduler la voie de réponse à l'IFN-I

1- Effet de l'expression de l'ORF1 ou de ses différents domaines sur l'activité du promoteur ISRE

Afin d'évaluer la capacité de l'ORF1 et de ses différents domaines à moduler l'activation du promoteur ISRE, des cellules 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour le gène de la luciférase *firefly* sous le contrôle du promoteur ISRE, un plasmide codant pour le gène de la β -galactosidase pour normaliser les résultats et les plasmides codant pour l'ORF1 ou ces différents domaines. Un plasmide codant pour la protéine SOCS3 a été utilisé comme contrôle positif car cette protéine cellulaire inhibe la voie de signalisation IFN-I⁵⁶³ et le vecteur vide pCINeo (pV) ainsi qu'un plasmide codant pour la protéine VP2 du BTV (qui n'a pas d'effet sur cette voie de signalisation ; résultats du laboratoire, non publié) ont été utilisés comme contrôles négatifs. Après 18h de transfection, les cellules ont été traitées avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 8h afin de stimuler la voie de signalisation JAK-STAT. Les analyses statistiques ont été réalisées en comparaison des résultats obtenus avec le vecteur vide (pV). Comme le montre la figure 26, le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe l'activation du promoteur ISRE de manière statistiquement significative, suggérant un effet modulateur du domaine MetPCP sur la voie JAK-STAT. Au contraire, l'ORF1 complète, le domaine Y, le domaine PCP et le domaine X n'ont pas d'effet inhibiteur sur l'activation du promoteur ISRE.

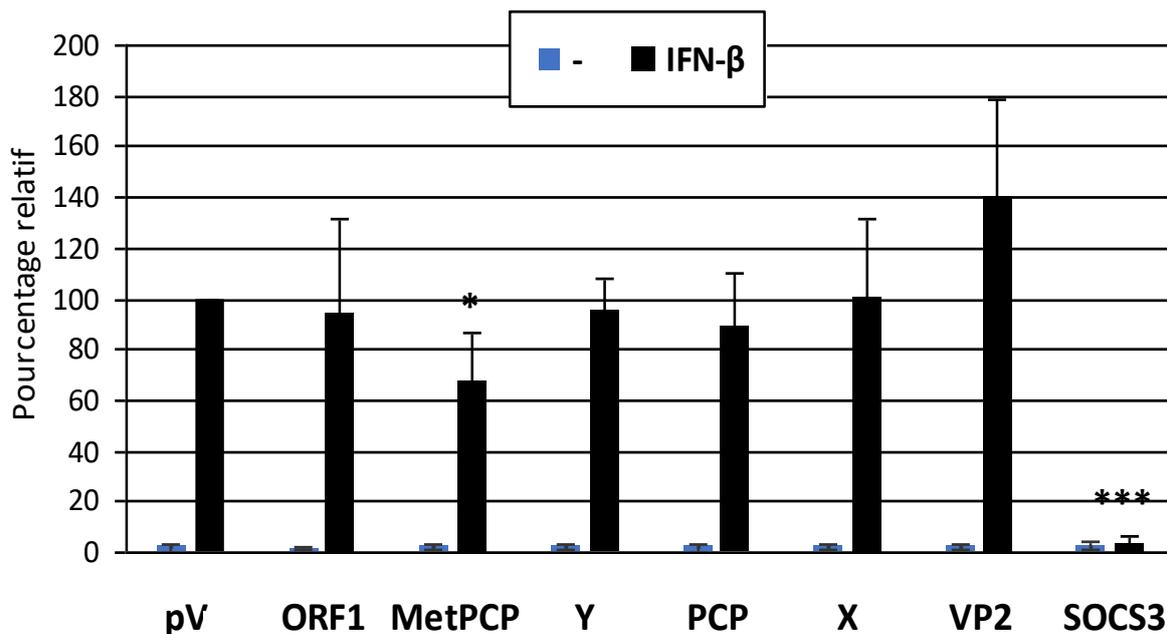


Figure 26. Effet de l'ORF1 et de ses différents domaines sur l'activation du promoteur ISRE. Des cellules 293T ont été transfectées avec pISRE (100ng), pRSV-βgal (50ng) et le plasmide vide (pV) ou un plasmide codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines, ou un plasmide codant pour la protéine SOCS3 cellulaire (250ng). Les résultats représentent les moyennes de quatre expériences indépendantes, chaque expérience étant réalisée en triplicat. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au vecteur vide traité à l'IFN-β pV. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison de la condition contrôle traitée à l'IFN-β (pV). *, $p < 0.05$; *** < 0.0005 (test t de Student avec la correction de Welsh).

2- Construction de vecteurs d'expression codant pour différents fragments du domaine MetPCP

Afin de déterminer si l'effet du domaine MetPCP sur l'activation du promoteur ISRE viendrait du domaine complet ou d'un sous domaine de MetPCP, nous avons cloné les domaines Met, YPCP et MetY dans des vecteurs pCINeo3xFlag (Figure 27A). Nous avons ensuite transfecté des cellules 293T avec ces plasmides exprimant les différents domaines construits pFLAG-Met, pFLAG-MetY et pFLAG-YPCP et nous avons analysé leur expression par immunoblot. Toutes les constructions s'expriment aux tailles attendues dans les cellules 293T (Figure 27B). Nous avons ensuite effectué un test rapporteur luciférase afin de déterminer si les domaines Met, MetY ou YPCP inhibent l'activation du promoteur ISRE. Comme le montre la figure 27C,

ni le domaine Met seul, ni le domaine YPCP et ni le domaine MetY n'ont d'effet sur l'activation du promoteur ISRE.

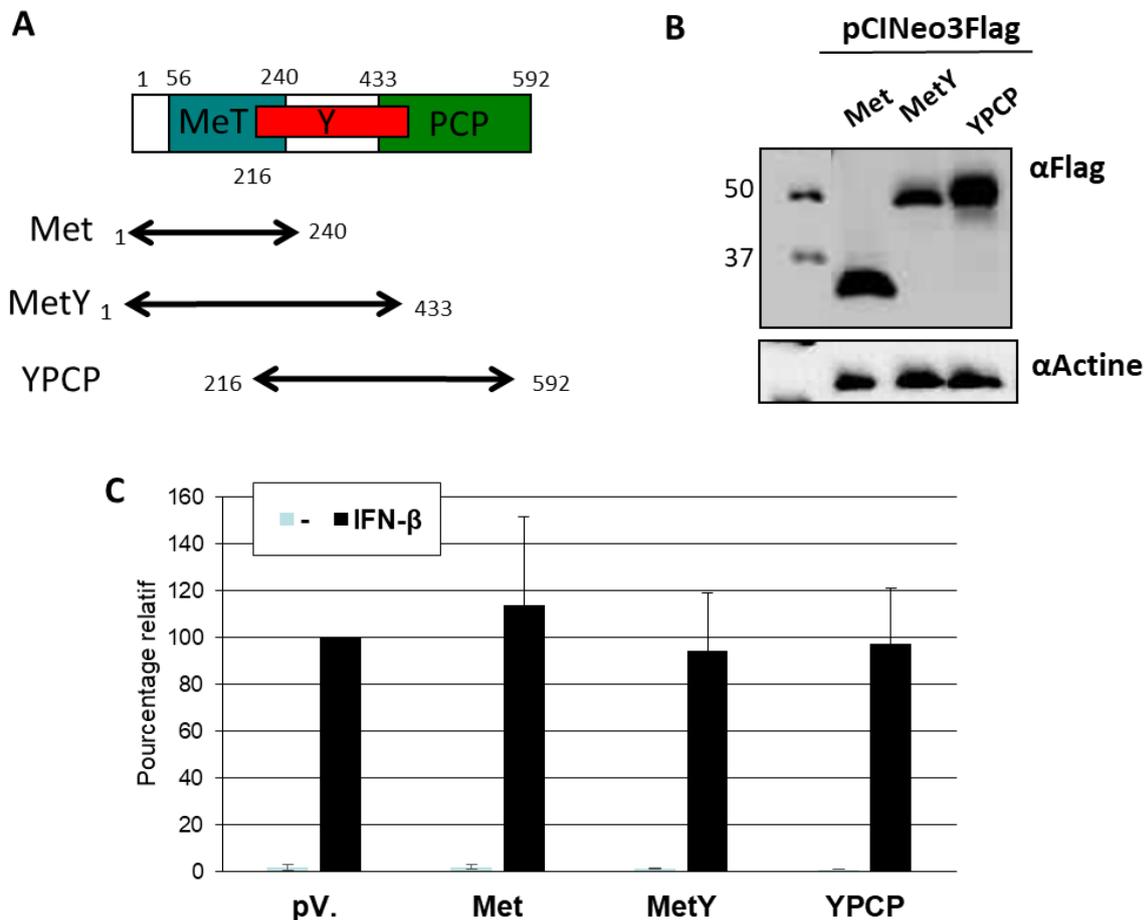


Figure 27. Construction de vecteurs d'expression codant pour les différents domaines du MetPCP et étude de leur effet sur l'activation du promoteur ISRE.

(A) Schéma du domaine MetPCP et des différentes constructions réalisées (Met, MetY et YPCP). (B) Les cellules 293T ont été transfectées avec les différents vecteurs d'expression construits. A 18h post-transfection, les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression de FLAG-Met (24 kDa), FLAG-MetY (48 kDa), FLAG-YPCP (47 kDa) et de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot. (C) Des cellules 293T ont été transfectées avec pISRE (100ng), pRSV-βgal (50ng) et le plasmide vide (pV) ou les plasmides les différents domaines Met, MetY, YPCP (250ng). Les résultats représentent les moyennes de trois expériences indépendantes, chaque expérience étant réalisée en triplicat. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au vecteur vide pV traité à l'IFN-β. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison de la condition contrôle traitée à l'IFN-β (pV). *, p<0.05 (test t de Student avec la correction de Welsh).

3- *Le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la synthèse de certains ISGs*

Afin de confirmer les résultats obtenus dans les tests rapporteurs luciférase ISRE, nous avons analysé l'expression des ARNm codant pour certains ISGs par RT-PCRq après transfection d'un plasmide codant pour le domaine MetPCP. Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide pVF₃ comme contrôle négatif, les plasmides codant pour les domaines MetPCP ou PCP de l'ORF1 et un plasmide codant pour la protéine V du MV comme contrôle positif. En effet, cette protéine inhibe la voie de signalisation JAK-STAT. La protéine V se lie à JAK1 pour inhiber la phosphorylation de STAT1^{523,524}. De plus, elle interagit également directement avec STAT1, STAT2, IRF9^{523,525-528} et TYK2 pour bloquer la phosphorylation de ce dernier⁵²⁹. Après 40h de transfection, les cellules ont été traitées avec 500UI/ml d'IFN- β pendant 6h afin de stimuler la voie JAK-STAT et d'induire l'expression de différents ISGs. Une analyse par RT-PCRq a permis de montrer que l'expression des ARNm codant pour OAS1, MDA5 et l'ISG56 est diminuée dans les cellules exprimant le domaine MetPCP mais pas le domaine PCP (Figures 28B/C/D). Dans cette expérience, les cellules ont été analysées 40h après la transfection au lieu de 24h afin d'obtenir une expression plus forte des domaines transfectés et de pouvoir détecter une inhibition potentielle de l'expression d'ISGs par les domaines d'intérêt. Nous avons vérifié l'absence de toxicité de la transfection et de l'expression des protéines d'intérêt au bout de 40h. Comme le montre la figure 28A, les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1 n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire au bout de 40h de transfection. Ces résultats confirment l'effet inhibiteur du domaine MetPCP sur le promoteur ISRE observé par tests rapporteurs luciférase.

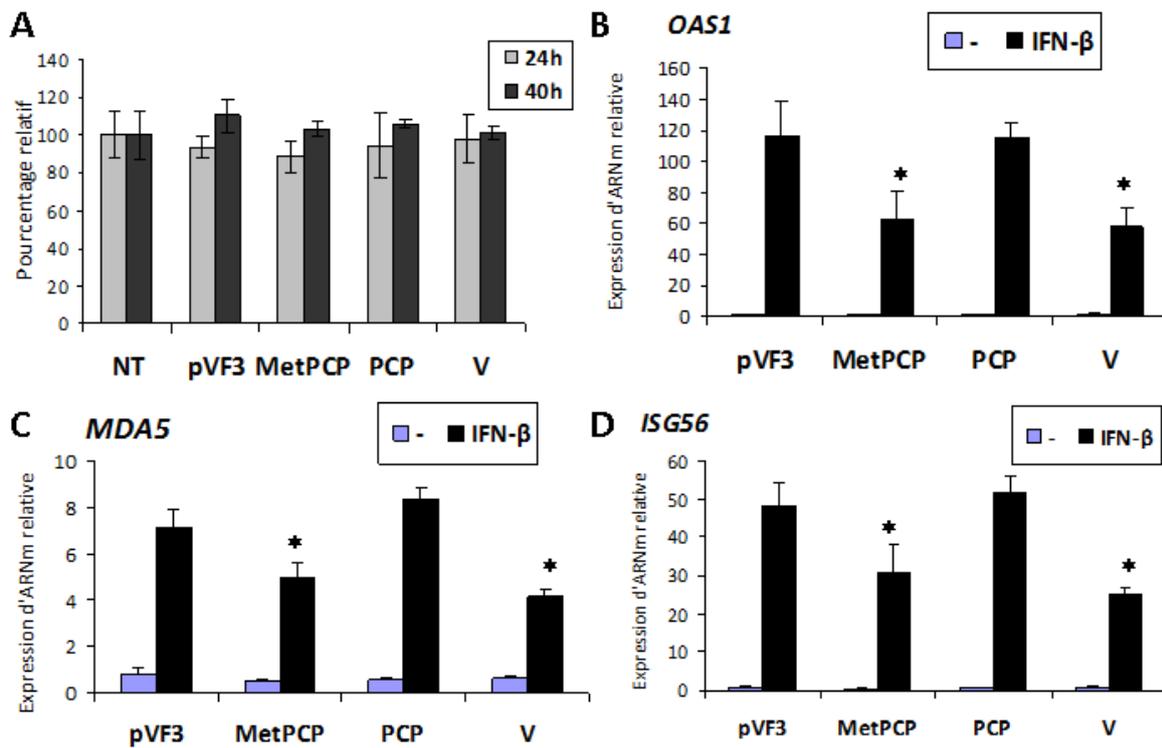


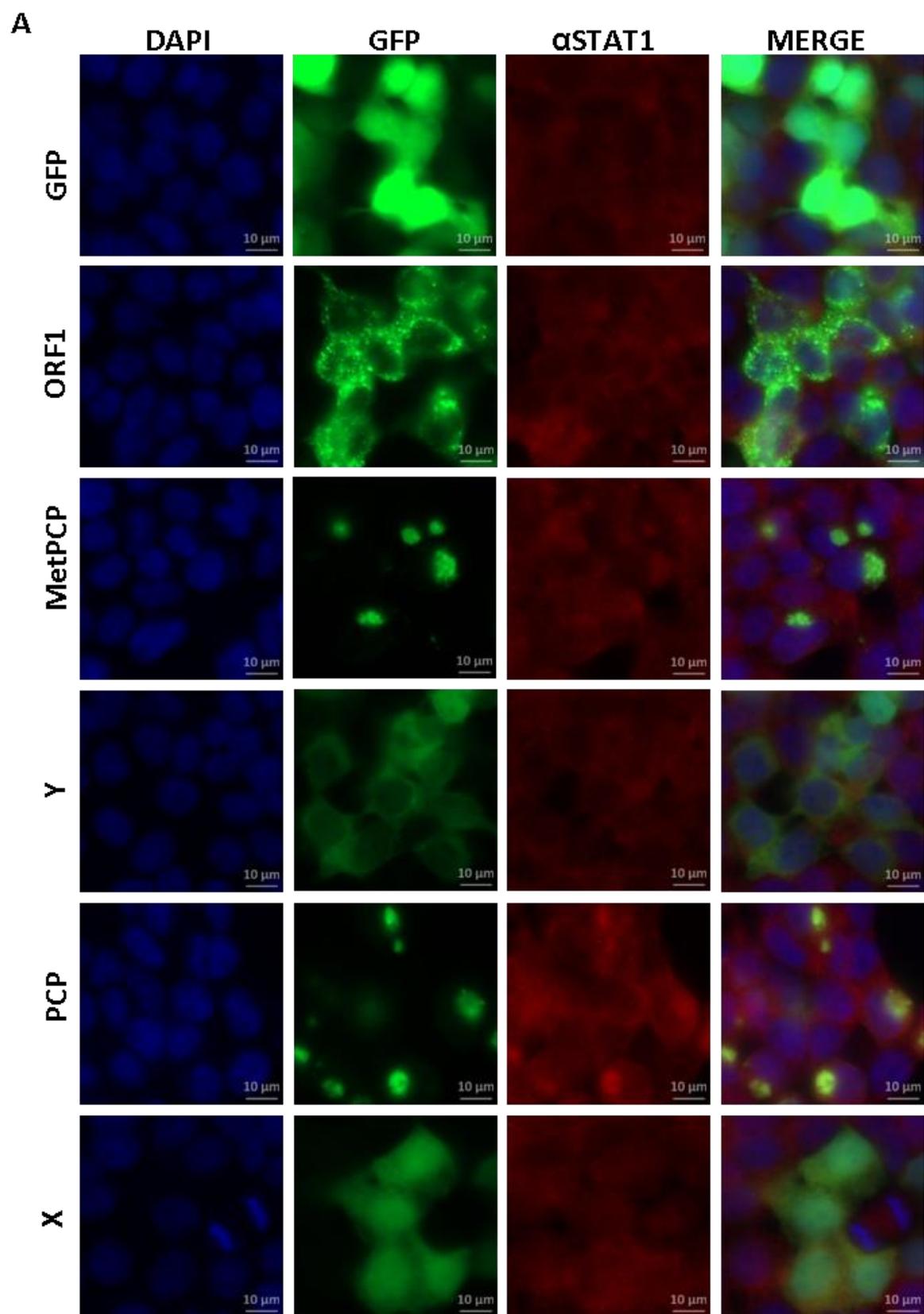
Figure 28. Le domaine MetPCP inhibe l'expression de certains ISGs.

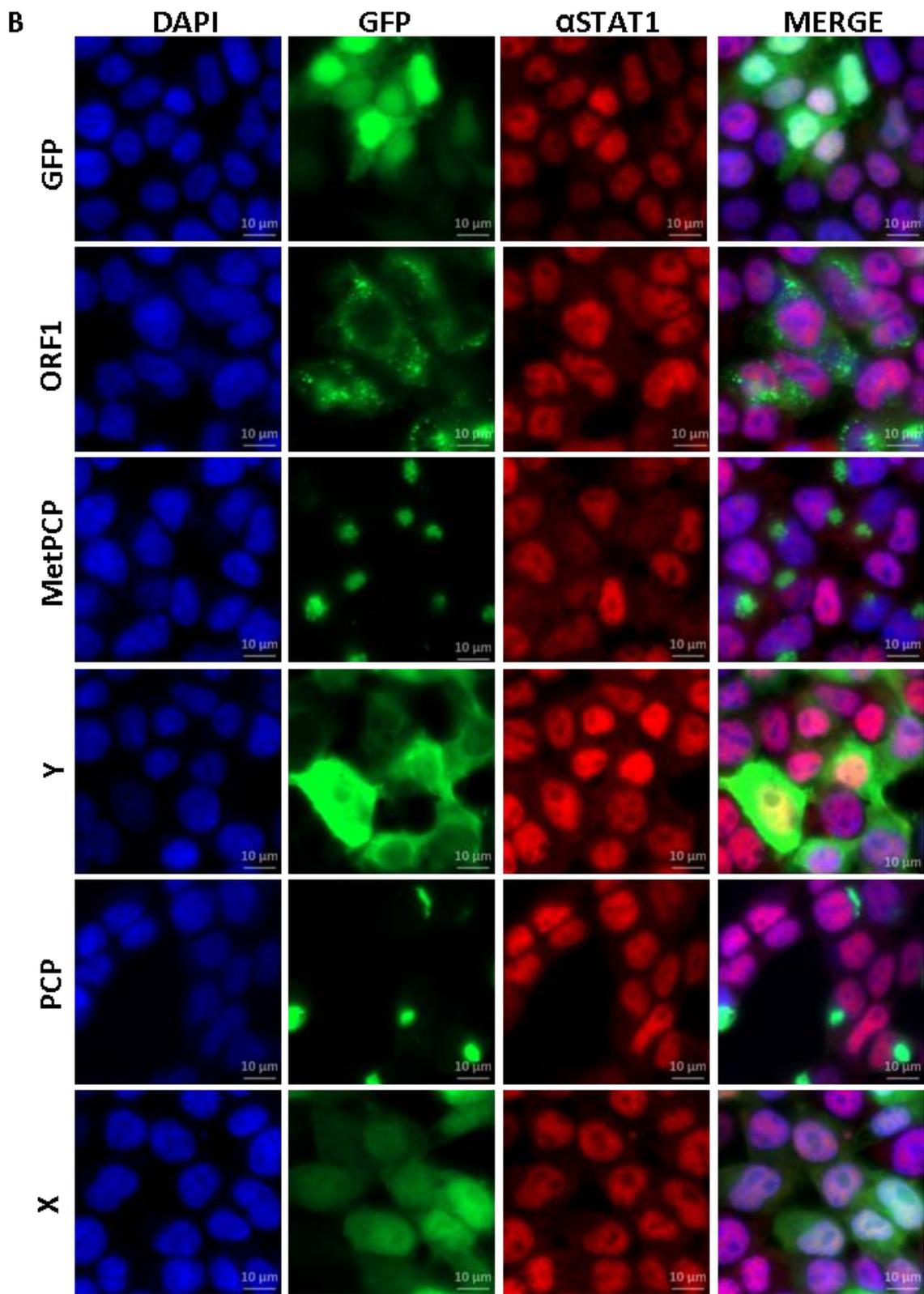
(A) Test de viabilité cellulaire à 24h et 40h post transfection. Les cellules 293T ont été transfectées ou non (NT=non transfecté) avec 100ng du vecteur vide 3Flag (pVF₃), et les plasmides codant pour FLAG-PCP et FLAG-MetPCP ou le plasmide codant pour la protéine V du MV associée à une étiquette 3Flag pFLAG-V. Après 24h ou 40h de transfection, les cellules ont été lysées et la viabilité cellulaire a été étudiée en utilisant le kit CellTiter-Glo™. Les résultats sont représentés en pourcentage relatif par rapport au contrôle non transfecté (NT). L'expérience a été reproduite 3 fois indépendamment et les barres d'erreurs représentent les moyennes de triplicats d'une expérience. (B ; C et D) Des cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide 3Flag (pVF₃), un plasmide codant pour la protéine V du MV ou les plasmides codant pour les domaines MetPCP et PCP de l'ORF1 du HEV (2µg). A 40h post-transfection, les cellules ont été stimulées pendant 6h avec 500UI/ml d'IFN-β. Après extraction des ARNs totaux, l'expression des ARN codant pour OAS1 (B), MDA5 (C) et l'ISG56 (D) a été mesurée par RT-PCRq. GAPDH a été utilisée comme gène de référence endogène. Les résultats représentent la moyenne de triplicats biologiques et de duplicats techniques d'une expérience. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison de la condition contrôle (pVF₃). *, p<0.05 (test t de Student avec la correction de Welsh).

4- Le domaine MetPCP de l'ORF1 bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau

Ensuite, afin de déterminer si le blocage de la voie de signalisation de JAK/STAT, par le domaine MetPCP, a lieu en amont ou en aval de la translocation de STAT1 dans le noyau, des

expériences d'immunofluorescence ont été réalisées après stimulation par l'IFN- β . Nous avons transfecté des cellules 293T avec les plasmides codant pour l'ORF1 ou les différents domaines fusionnés à une étiquette EGFP à leur extrémité N-terminale ou le plasmide codant pour l'EGFP seule (pEGFP-C1) comme contrôle négatif. Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées pendant 30 minutes avec 1000UI/ml d'IFN- β afin d'induire la translocation de STAT1 dans le noyau. Comme le montre la figure 29, le domaine MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau mais pas dans toutes les cellules exprimant le domaine. En effet, 50% des cellules qui expriment le domaine MetPCP présentent une localisation de STAT1 inchangée comparé au contrôle (Figures 29B et C). Pour les cellules qui expriment l'ORF1 complète ou le domaine PCP, on observe une translocation de STAT1 dans 70% des cellules comptées alors que pour les cellules qui expriment la protéine GFP seule, le domaine X et le domaine Y, la translocation de STAT1 dans le noyau est observée pour 90% des cellules. Ces résultats montrent que le domaine MetPCP est capable d'interférer avec l'entrée de STAT1 dans le noyau, c'est-à-dire qu'il bloquerait la voie de signalisation soit au niveau de l'entrée de STAT1, soit plus en amont dans la voie de signalisation.





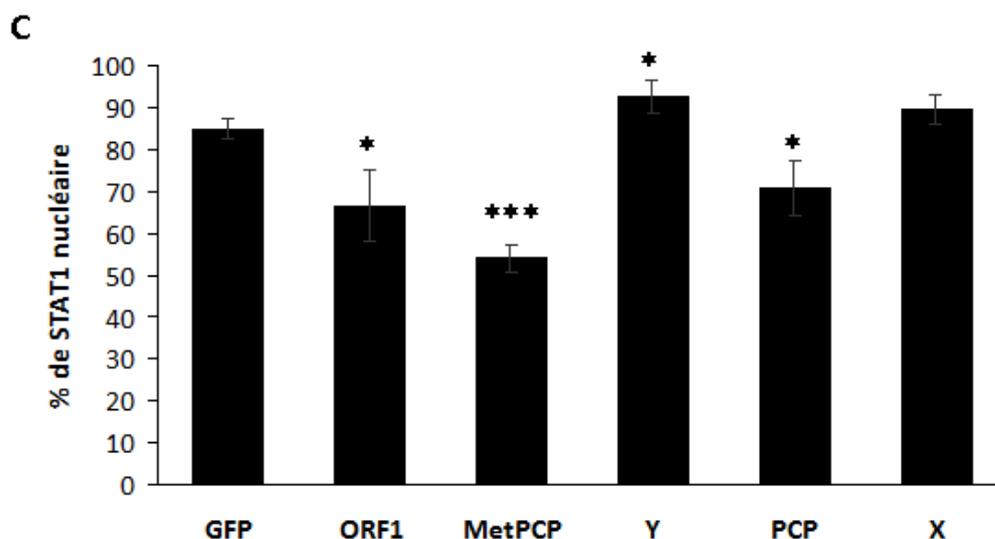
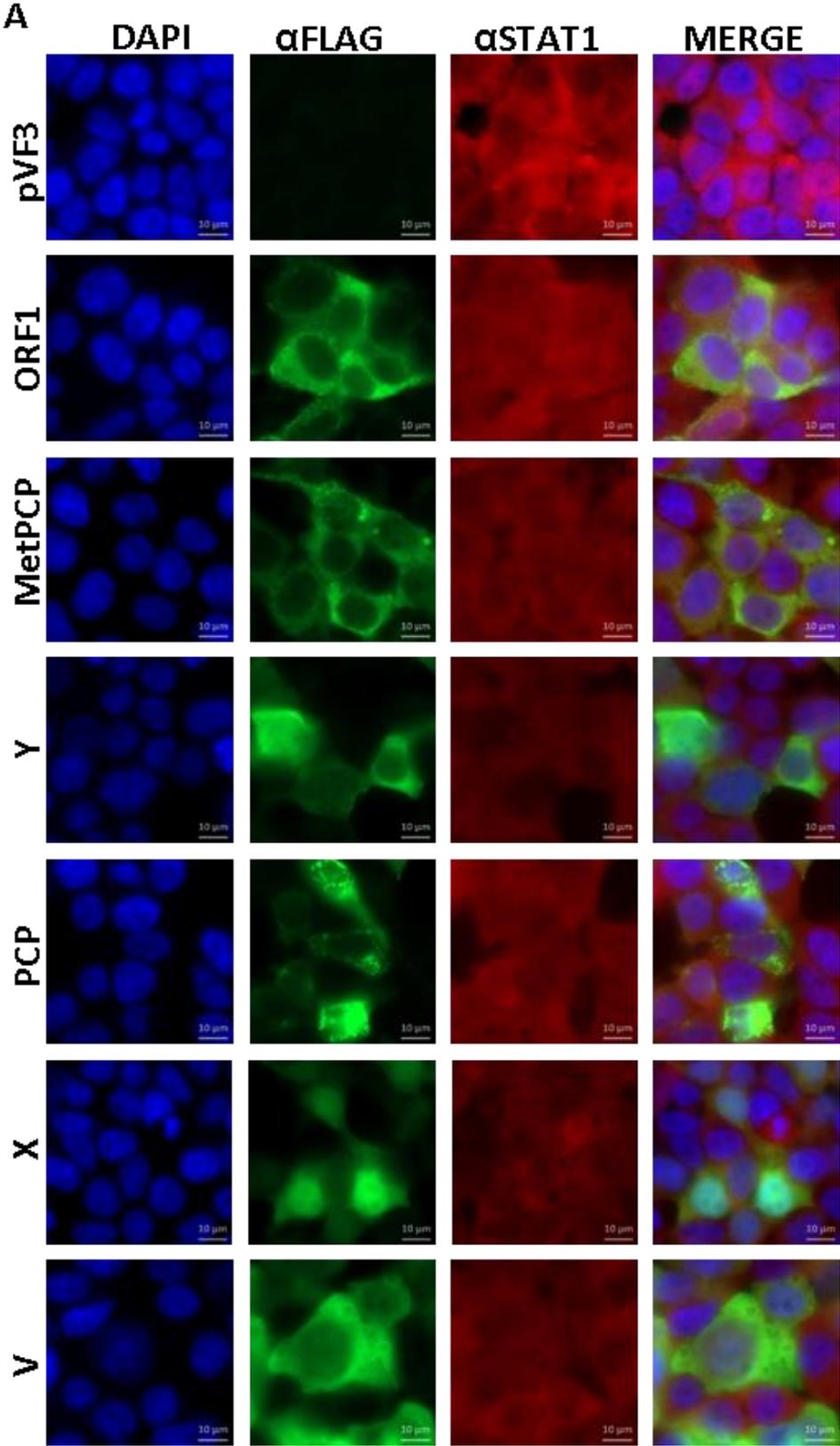


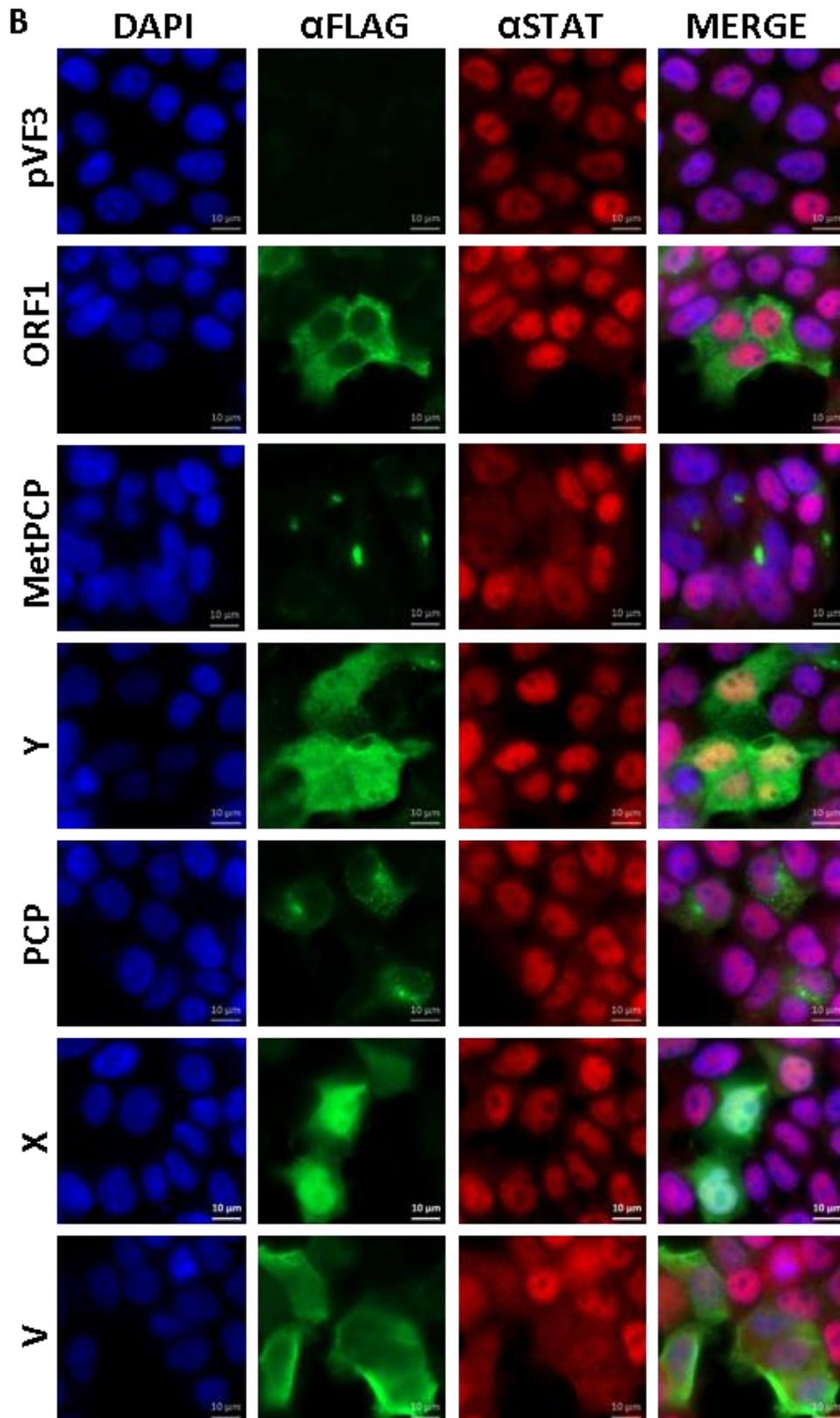
Figure 29. Le domaine GFP-MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau.

Les plasmides codant pour la GFP, GFP-ORF1, GFP-MetPCP, GFP-Y, GFP-PCP et GFP-X ont été transfectés dans des cellules 293T. Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées (B) ou non (A) avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 30 minutes. Après fixation, les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-STAT1, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire conjugué à une molécule DyLight 550 (rouge). Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630). Entre 100 et 200 cellules ont été comptées dans 10 champs par expérience et l'expérience a été reproduite 3 fois indépendamment. (C) Moyennes des comptages des trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison avec la condition contrôle (GFP). * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$.

Ces résultats ont été confirmés avec les plasmides codant pour les différents domaines associés à une étiquette FLAG. Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines associés à l'étiquette FLAG ou avec le plasmide pCINeo3Flag comme contrôle négatif ou le plasmide codant pour la protéine V du MV pFLAG-V comme contrôle positif. Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées pendant 30 minutes avec 1000UI/ml d'IFN- β afin d'induire la translocation de STAT1 dans le noyau. Comme le montre la figure 30, le domaine FLAG-MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau. En effet, après transfection du plasmide exprimant MetPCP, STAT1 est localisé dans le noyau dans environ 65% des cellules exprimant le domaine. Après transfection de la protéine V du MV, qui sert ici de contrôle positif, 40% des cellules présentent une localisation de STAT1 nucléaire (Figure 30 B et C). Au contraire, après

transfection du vecteur vide pVF₃, des plasmides exprimant l'ORF1, le domaine PCP, le domaine Y ou le domaine X, 90% des cellules expriment STAT1 au niveau du noyau.





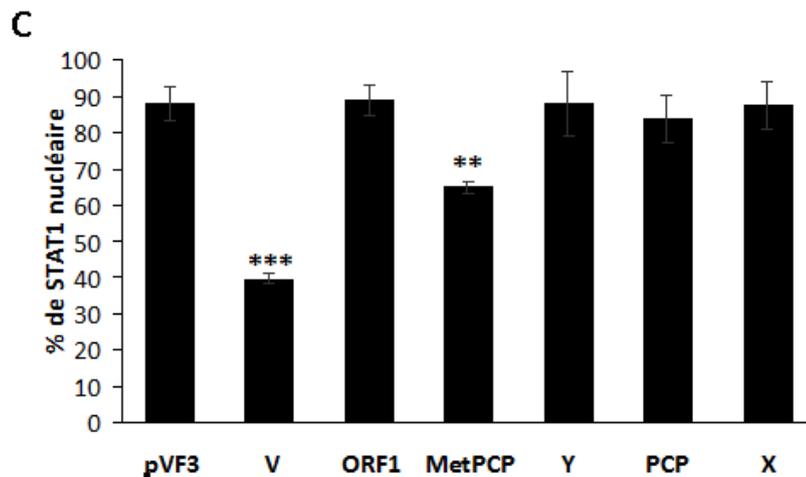


Figure 30. Le domaine FLAG-MetPCP bloque l'entrée de STAT1 dans le noyau.

Le plasmide vide pVF3 et les plasmides codant pour FLAG-ORF1, FLAG-MetPCP, FLAG-Y, FLAG-PCP et FLAG-V ont été transfectés dans des cellules 293T. Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées (B) ou non (A) avec 1000UI/ml d'IFN- β pendant 30 minutes. Après fixation, les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-STAT1 de lapin et anti-FLAG de souris, suivi par une incubation avec des anticorps secondaires respectivement conjugués à une molécule DyLight 550 (rouge) anti-lapin ou à une molécule DyLight 488 (vert) anti-souris. Le noyau (bleu) a été visualisé avec une coloration DAPI (grossissement x630). Entre 50 et 400 cellules ont été comptées dans 10 à 14 champs par expérience et l'expérience a été reproduite 3 fois indépendamment. (C) Moyennes des comptages des trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison avec la condition contrôle (pVF3). **p<0.005 ; ***p<0.0005.

5- Le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de STAT1

Afin de déterminer si le blocage de la voie de signalisation JAK-STAT par le domaine MetPCP a lieu au niveau de la translocation de STAT1 ou en amont, l'état de phosphorylation des protéines STAT1 et STAT2 a été étudié. En effet, l'étape de phosphorylation de STAT1 et STAT2 est nécessaire à leur translocation nucléaire après stimulation par l'IFN- β . Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour le domaine MetPCP ou le domaine PCP ou avec le vecteur vide 3Flag (pVF3) comme contrôle négatif ou avec un plasmide codant pour la protéine V du MV comme contrôle positif, car cette protéine inhibe la phosphorylation de STAT1 et de STAT2 ^{523,525}. Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées avec 500UI/ml d'IFN- β pendant 30 minutes et les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblot (Figure 31). Comme attendu, la protéine V du MV inhibe la

phosphorylation de STAT1 et de STAT2. Le domaine PCP, pour lequel aucun effet inhibiteur n'a été détecté sur l'activité du promoteur ISRE, n'inhibe pas la phosphorylation de STAT1 et de STAT2. Au contraire, le domaine MetPCP induit une diminution de l'expression de la forme phosphorylée de STAT1 mais pas de la forme phosphorylée de STAT2. La quantité totale de STAT1 n'est pas modifiée, suggérant que MetPCP n'inhibe pas l'expression de STAT1 ni n'entraîne sa dégradation. L'inhibition est donc spécifique de l'étape de phosphorylation de STAT1, suggérant que l'activité inhibitrice du domaine MetPCP a lieu au niveau de STAT1 ou plus en amont dans la voie, par exemple au niveau des protéines JAK1 et TYK2, qui sont les protéines qui phosphorylent STAT1 et STAT2.

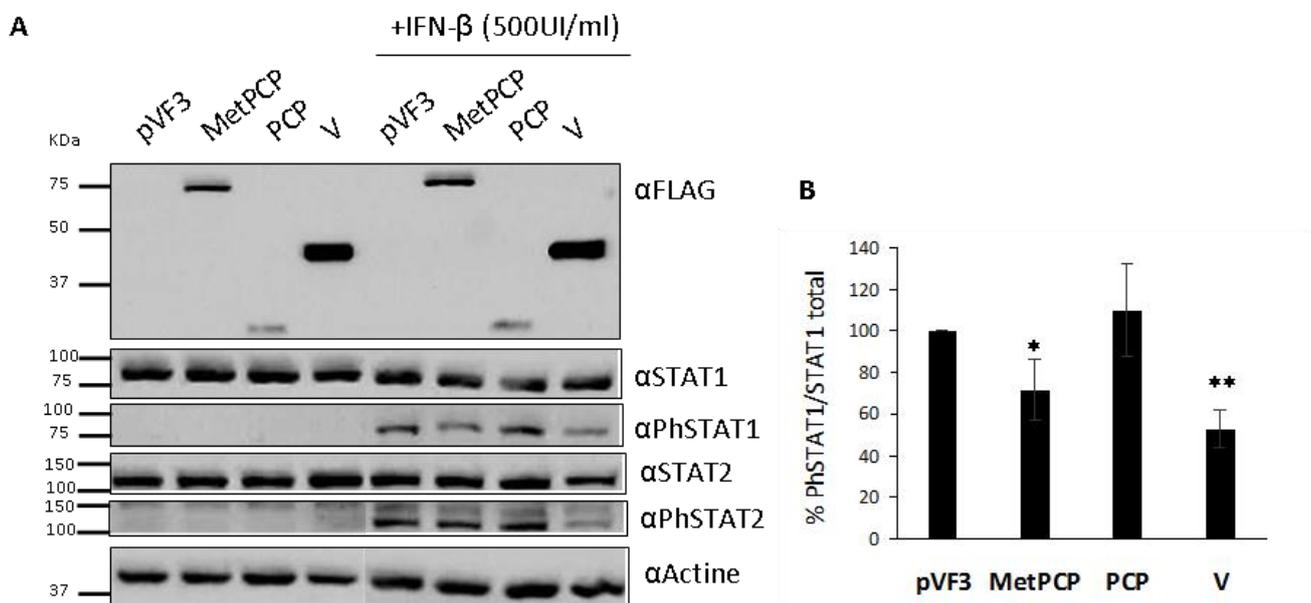


Figure 31. Le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de STAT1.

(A) Les cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide 3F (pVF3), ou un plasmide codant pour la protéine V du MV ou les domaines MetPCP ou PCP de l'ORF1 du HEV-3 (2 μ g). Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec 500UI/ml d'IFN- β . Les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression des différentes protéines fusionnées à une étiquette FLAG, de STAT1 (91 kDa), PhSTAT1 (92 kDa), STAT2 (113 kDa), PhSTAT2 (113 kDa) et de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot. Les résultats sont représentatifs d'une expérience réalisée quatre fois indépendamment. **(B)** L'intensité des bandes de quatre expériences indépendantes a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et la quantité relative mesurée pour PhSTAT1 a été divisée par celle obtenue pour STAT1 totale. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle pVF3. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type et les valeurs-p ont été calculées en comparaison avec la condition contrôle (pVF3). *p<0.05 ; **p<0.005.

6- Le domaine MetPCP de l'ORF1 n'inhibe pas la phosphorylation de JAK1

La phosphorylation de STAT1 nécessite en amont la phosphorylation des protéines TYK2 et JAK1. Ainsi, afin de déterminer si l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par MetPCP a lieu au niveau de STAT1 ou plus en amont au niveau de la phosphorylation des protéines TYK2 et JAK1, la phosphorylation de ces dernières a été évaluée par immunoblot. Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide pVF₃ comme contrôle négatif, ou un plasmide codant pour le domaine MetPCP ou le domaine PCP ou la protéine V du MV. Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec 500UI/ml d'IFN- β avant de les lyser. Les lysats ont été analysés par immunoblot. Comme le montre la figure 32, le domaine MetPCP n'a pas d'effet sur le niveau de phosphorylation de JAK1 alors qu'elle inhibe bien la phosphorylation de STAT1. Du fait d'un bruit de fond important sur les immunoblots et d'une faible expression de TYK2, nous n'avons pas été en mesure de conclure sur l'état de phosphorylation de la protéine TYK2 dans ces expériences.

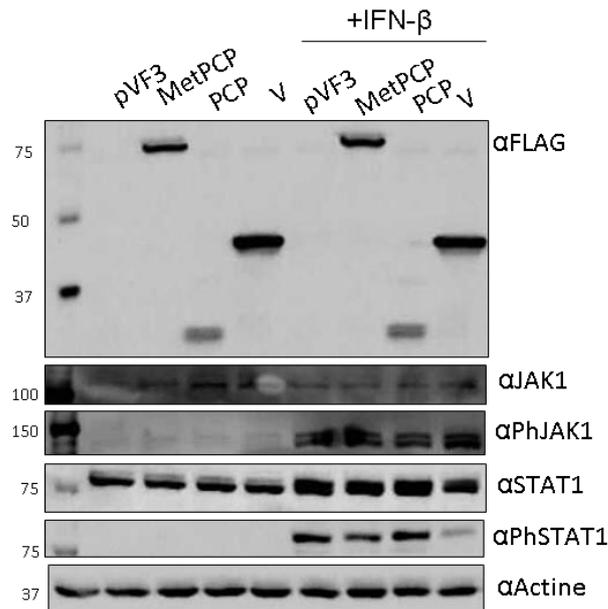


Figure 32. Le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV n'inhibe pas la phosphorylation de JAK1.

Les cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide 3Flag (pVF₃), les plasmides codant pour la protéine V du MV ou les domaines MetPCP ou PCP de l'ORF1 du HEV (2 μ g). Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec 500UI/ml d'IFN- β . Les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression des différentes protéines fusionnées à une étiquette FLAG, de JAK1 (130 kDa), PhJAK1 (130 kDa), STAT1 (91 kDa), PhSTAT1 (92 kDa) STAT2 (113 kDa), PhSTAT2 (113 kDa) et de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot. L'expérience est représentative de deux expériences réalisées de manière indépendante.

7- L'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par le domaine MetPCP est spécifique de la voie de réponse à l'IFN- β

L'activation de l'IFNGR induit la phosphorylation de STAT1 qui va s'homodimeriser pour activer l'expression de certains ISGs. Afin de déterminer si l'inhibition de STAT1 est spécifique de la réponse IFN- β ou si le domaine MetPCP est capable d'inhiber la phosphorylation de STAT1 également après stimulation de la voie de réponse à l'IFN- γ , nous avons transfecté des cellules avec les plasmides codant pour le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV, ou avec le vecteur vide pVF3 comme témoin négatif ou avec un plasmide codant pour la protéine V du MV comme témoin positif de l'inhibition de la voie de réponse à l'IFN- β . Après 24h de transfection, les cellules ont été traitées avec 250ng/ μ l d'IFN- γ ou 500UI/ml d'IFN- β pendant 30 minutes pour induire la phosphorylation des protéines STAT. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par immunoblot. Comme observé précédemment, le domaine MetPCP de l'ORF1, comme la protéine V du MV inhibent la phosphorylation de STAT1 après stimulation avec l'IFN- β . Au contraire, le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV n'inhibe pas la phosphorylation de STAT1 après stimulation avec l'IFN- γ , suggérant que l'inhibition serait spécifique de la voie de réponse à l'IFN- β (Figure 33).

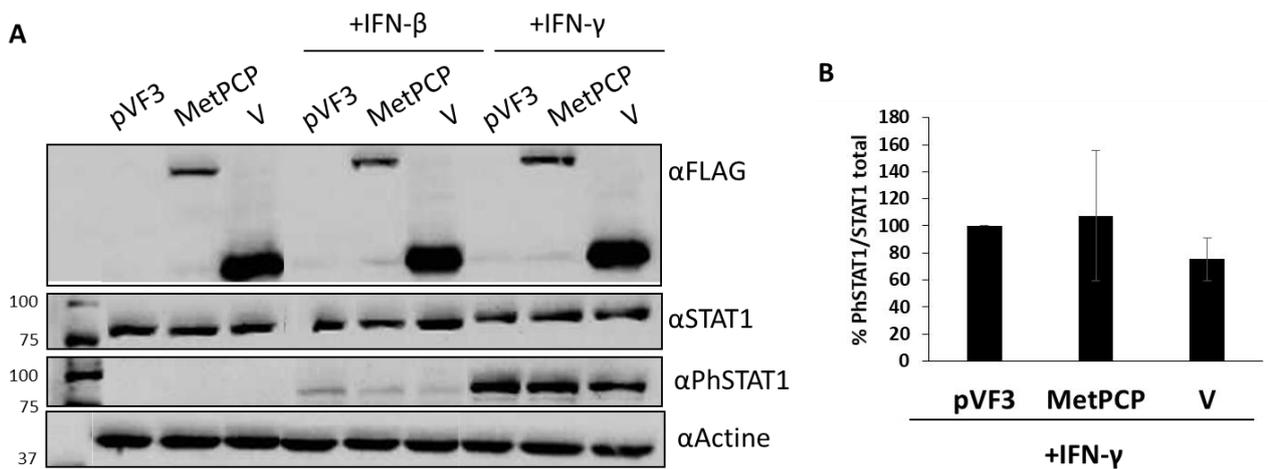


Figure 33. L'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par le domaine MetPCP est spécifique de la voie de réponse à l'IFN- β .

(A) Des cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur vide 3F (pVF3), un plasmide codant pour la protéine V du MV ou le domaine MetPCP de l'ORF1 du HEV (2 μ g). Après 24h de transfection, les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec 500UI/ml d'IFN- β ou 250ng/ μ l d'IFN- γ . Les lysats cellulaires ont été préparés et l'expression des différentes protéines-FLAG, de STAT1 (91 kDa), PhSTAT1 (92 kDa) STAT2 (113 kDa), PhSTAT2 (113 kDa) et de l'actine (42 kDa) a été analysée par immunoblot. L'expérience est représentative de trois expériences réalisées de manière indépendantes. **(B)** L'intensité des bandes de trois expériences indépendantes a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et la quantité relative mesurée pour PhSTAT1 a été divisée par celle obtenue pour STAT1 totale. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle pVF3.

IV- DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ORF1 du HEV code pour une polyprotéine pour laquelle différents domaines non-structuraux ont été décrits, notamment un domaine Met, un domaine Y de fonction inconnue, un domaine protéase PCP, un domaine hypervariable HVR, un macrodomaine X, une hélicase et une ARN polymérase ARN dépendante. De façon intéressante, certains de ces domaines présentent des homologies avec des domaines retrouvés dans le génome d'autres virus, et pour lesquels un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et notamment du système IFN-I a été démontré. Cependant, le rôle de l'ORF1 du HEV dans la modulation du système IFN-I a été peu étudié. L'objectif de cette partie de mon projet de thèse a donc été de déterminer si certains domaines de l'ORF1 pouvaient avoir un effet sur les voies de signalisation de l'IFN-I.

Afin de déterminer si les différents domaines de l'ORF1 du HEV-3 ont un effet sur les voies de signalisation de l'IFN-I, nous avons dans un premier temps entrepris la construction de vecteurs d'expression codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines (MetPCP, PCP, X et Y). L'étude de l'expression de la protéine ORF1 par immunoblot a montré la présence de différentes bandes à des tailles inférieures à celles attendues, suggérant que l'ORF1 du HEV serait clivée dans les cellules 293T (Figures 22 et 34). Cependant, le clivage de l'ORF1 en différents domaines fonctionnels n'est pas clairement établi. En effet, certaines études ont montré une absence de clivage alors que d'autres ont montré le clivage en fragments de différentes tailles. Nous avons observé des bandes à des poids moléculaires d'environ 35 kDa, 70 kDa et 130 kDa en plus de la bande attendue pour l'ORF1 complète à un poids moléculaire de 192 kDa. L'étiquette FLAG étant à l'extrémité N-terminale de l'ORF1, nous détectons des fragments de clivage contenant l'étiquette FLAG. Il est donc probable que certains sites de clivage ne soient pas mis en évidence dans nos expériences. Il serait intéressant de construire un plasmide codant pour l'ORF1 avec l'étiquette FLAG en C-terminale afin de pouvoir comparer avec les potentiels sites de clivage observés dans nos expériences.

Les tailles de fragments détectés dans cette étude (d'environ 35, 70 et 130 kDa) correspondent à celles obtenues dans certaines de ces études. Notamment, le fragment N-terminal d'environ 35 kDa a été obtenu après transfection de cellules HepG2 avec un clone infectieux codant pour le génome complet du HEV ⁹⁴, en utilisant un système d'expression en baculovirus ⁹⁶, dans un système d'expression en *E. coli* ⁹⁷ et dans des cellules Huh7 exprimant l'ORF1 fusionnée avec une étiquette histidine ⁹⁸. Nos résultats semblent donc corroborer ces différents résultats publiés. Dans un système d'expression en baculovirus de l'ORF1, des fragments de 22, 35, 47 et 98 kDa avec l'étiquette 6xHis (à l'extrémité N-terminale de l'ORF1) et des fragments de 26, 59, 93, 106 et 122 kDa avec l'étiquette FLAG (à l'extrémité C-terminale de l'ORF1) ont été observés, ce qui a permis de déterminer des sites potentiels de clivage au sein de l'ORF1 (Figure 34A) ⁹⁶. En plus du fragment d'environ 35 kDa, nous avons également observé des bandes d'environ 70 et 130 kDa (Figure 22 et 34). Ces bandes correspondraient à des sites de clivages présents à la fin du domaine Met, à la fin du PCP et entre le domaine Hel et RdRp identifiés ⁹⁶ (Figure 34A), suggérant des clivages de l'ORF1 en fragments correspondant aux domaines Met, Y-PCP, HVR-X-Hel et RdRp ⁹⁶. Nos

résultats semblent donc en accord avec l'étude en système d'expression baculovirus et suggèrent que l'ORF1 serait clivée en au moins 4 différentes protéines.

Une étude dans des cellules Huh7-S10-3 exprimant des mutants au niveau de l'ORF1 a également montré la présence d'un site catalytique au niveau du domaine PCP constitué de 6 cystéines (C457, C459, C471, C472, C481 et C483) et de 3 histidines (H443, H497 et H590)⁹⁸. De plus, il a également été mis en évidence trois glycines très conservées en aval du domaine X (G815-G816-G817), homologues au site de clivage de la protéase du RubV. Ce site potentiel de clivage du domaine PCP est également présent dans la séquence du HEV-3 que nous utilisons, cependant nous n'avons pas observé de bande avec une taille de 90 kDa qui pourrait correspondre à ce site de clivage. Notre système ne nous permettant d'observer que les fragments liés à l'étiquette FLAG, il est possible que d'autres fragments aient été générés mais qu'ils n'aient pas été détectés par immunoblot.

Une autre étude a mis en évidence un site catalytique au niveau des acides aminés H443, C472/C481/C483 et des sites de clivage de l'ORF1 au niveau des sites A15/I16 situé en N-terminal du domaine Met et A1364/V1365 situé dans la RdRp⁹⁷. Nous n'avons cependant pas observé de clivages à ces différents niveaux, suggérant également que des fragments de différentes tailles pourraient être générés que l'on ne puisse pas détecter avec notre système. Notamment, un fragment de la taille de 1-2 kDa, dû à un clivage au niveau du site A15/I16 serait difficile à visualiser sur gel de polyacrylamide 12%.

Le site catalytique mis en évidence au niveau des acides aminés H443, C472/C481/C483 a été retrouvé dans la séquence primaire du HEV-3 que nous utilisons au laboratoire. Cela suggère que le PCP de l'ORF1 utilisé dans nos expériences posséderait bien une activité protéase fonctionnelle et permettrait le clivage de l'ORF1.

Après transfection des cellules 293T avec un plasmide codant pour le domaine MetPCP, plusieurs bandes de taille inférieure à celle attendue (d'environ 40 et 60-70 kDa) ont été observées (Figure 22). Une bande d'une taille supérieure à 50 kDa (60-70 kDa) semble correspondre à une des bandes observées après transfection de l'ORF1 entière. Il semblerait donc que le domaine MetPCP soit également clivé en différents fragments. Cependant, nous n'avons pas obtenu une bande de la même taille (72 kDa) que le domaine MetPCP après expression de l'ORF1, il est donc possible que le domaine MetPCP exprimé dans cette étude

ne corresponde pas à un produit de clivage de l'ORF1, et qu'en contexte infectieux, une forme plus courte du domaine MetPCP soit produite après clivage de l'ORF1.

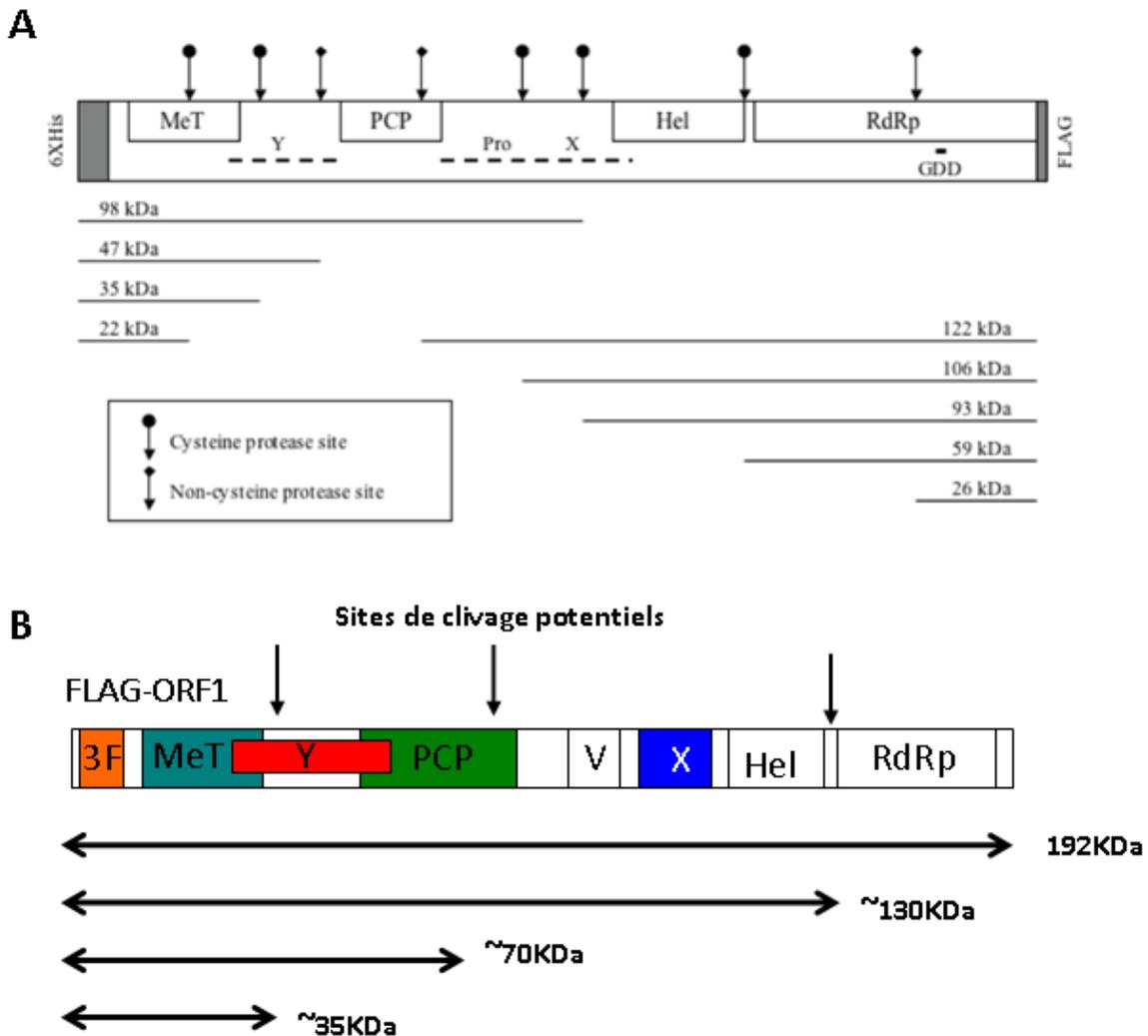


Figure 34. Comparaison de la taille des bandes observées après transfection de l'ORF1 dans nos expériences avec les fragments obtenus dans une autre étude.

(A) Fragments obtenus dans une étude antérieure et sites de clivage potentiels de l'ORF1 du HEV ⁹⁶ (B) Tailles des bandes observées par immunoblot, dans la présente étude, après transfection d'un plasmide codant pour FLAG-ORF1 dans les cellules 293T (flèches horizontales) et sites de clivages putatifs (flèches verticales).

L'étude de l'expression du domaine PCP de l'ORF1 a également montré la présence de plusieurs bandes, mais de taille supérieure (environ 35, 40 et 50 kDa) (Figure 22). De plus, le domaine PCP n'est pas à la taille attendue de 23 kDa mais plutôt vers 28 kDa. Ces résultats semblent indiquer que le domaine PCP pourrait subir différentes modifications post-traductionnelles. Par rapport à la taille des différentes bandes obtenues, nous avons émis

l'hypothèse que PCP pourrait être ubiquitinylé. En effet, PCP possède des sites potentiels d'ubiquitylation au niveau des lysines 32, 33, 37 et 43. Ces sites ont été identifiées en utilisant le logiciel de prédiction des sites d'ubiquitylation en ligne PDM-PUB (pour *Prediction of Ubiquitination sites with Bayesian Discriminant Method*)⁵⁶⁴. De plus, l'ubiquitine possède une taille de 8,5 kDa. La forme principale possède une taille d'environ 28 kDa, suivi d'une bande à une taille de 35 kDa environ puis d'une bande à une taille d'environ 40 kDa et enfin 50 kDa. L'ajout d'une, deux ou trois ubiquitines au domaine PCP donnerait des produits aux tailles des différentes bandes observées. Ces bandes pourraient également correspondre à de l'ISGylation. L'ISG15 ayant un poids moléculaire de 15 kDa, il est possible que la bande observée à 40 kDa soit la protéine PCP de 23 kDa associée à l'ISG15. De même, la présence d'une bande à 35 kDa pourrait correspondre à de la SUMOylation. La protéine SUMO, de 10 kDa, pourrait, en étant liée au PCP (23 kDa), donner une protéine de 35 kDa, comme observé par immunoblot. Il est possible que la différence de taille entre celle attendue (23 kDa) et celle observée (27-28 kDa) soit due à plusieurs processus de phosphorylation car il s'agit d'une modification qui change peu le poids moléculaire de la protéine cible (1 kDa).

Dans cette étude, la localisation subcellulaire de l'ORF1 et des différents domaines qui la compose a également été étudiée. L'ORF1 ainsi que les domaines MetPCP et PCP présentent une localisation cytoplasmique ponctiforme au niveau d'une région périnucléaire dans la cellule, alors que les domaines X et Y présentent une localisation diffuse (Figure 23). Une localisation ponctiforme de l'ORF1 et d'un domaine proche du MetPCP mais plus court (environ 100 acides aminés de moins) dans les cellules HeLa a déjà été observée dans une autre étude portant sur la localisation de l'ORF1 d'une souche de HEV-1⁹³. Dans celle-ci, l'ORF1 était localisée au niveau d'un compartiment intermédiaire entre le RE et le golgi appelé ERGIC. Ici, nous n'avons pas étudié la localisation de l'ORF1 complète. Cependant, l'étude de la localisation des domaines PCP et MetPCP a montré une co-localisation potentielle avec un marqueur spécifique du RE (α -kinectine). Cette localisation doit encore être confirmée par microscopie confocale ou par apotome et en utilisant d'autres marqueurs du RE et du ERGIC.

Aucune étude n'a encore été réalisée sur la localisation du domaine X du HEV. Une étude portant sur la localisation de macrodomaines cellulaires a montré la même expression

diffuse dans la cellule que celle du HEV ¹¹³. Il semblerait donc que la localisation du macrodomaine de l'ORF1 du HEV soit similaire à celles de certains macrodomaines cellulaires.

Un des objectifs de ce projet de thèse était de déterminer si l'ORF1 ou certains de ses domaines avaient un effet sur la voie de signalisation JAK-STAT. Pour cela, l'activation du promoteur ISRE a été étudiée après transfection de plasmides codant pour l'ORF1 ou ses différents domaines et d'un plasmide contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur ISRE. Les résultats obtenus ont permis de montrer que le domaine MetPCP, et non le domaine PCP et l'ORF1 complète, inhibe l'activation du promoteur ISRE. L'ORF1 étant exprimée à un niveau très faible en comparaison du domaine MetPCP, il est possible que son activité inhibitrice soit masquée dans le test rapporteur. De plus, le clivage potentiel de l'ORF1 en différents domaines semble se faire à un niveau assez faible. Il est possible que l'activité protéase de la PCP ne soit pas très efficace ou que l'expression de l'ORF1 doit être étudiée à des temps plus tardifs afin de mieux observer les différents produits de clivage. En effet, dans une publication étudiant le clivage de l'ORF1 en système d'expression baculovirus, l'analyse par immunoblot des fragments générés par l'ORF1 a montré que les formes clivées sont de plus en plus présentes au cours du temps après infection, jusqu'à devenir majoritaires à partir de 36h et jusqu'à 72h après l'infection ⁹⁶. L'ORF1 complète semble être la forme majoritaire exprimée après transfection dans les cellules 293T, ce qui limiterait la détection de l'effet que pourraient avoir certains produits de clivage de l'ORF1 sur la voie de réponse à l'IFN-I.

Nous avons ensuite effectué différentes expériences afin de déterminer à quel niveau de la voie de signalisation l'inhibition de la voie JAK-STAT avait lieu. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer que le domaine MetPCP de l'ORF1 inhibe la phosphorylation de STAT1 et interfère avec l'entrée de STAT1 dans le noyau. Cependant, l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par le domaine MetPCP est plus faible que l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 par la protéine V du MV, utilisée comme contrôle positif. Cette différence s'explique certainement, d'une part, par le fait que la protéine V est exprimée plus abondamment dans les cellules 293T par rapport au domaine MetPCP, comme observé par immunoblot, et, d'autre part, par le fait qu'elle agit à plusieurs niveaux de la voie de signalisation JAK-STAT. Notamment, la protéine V interagit avec JAK1 pour inhiber la phosphorylation de STAT1

^{523,524}, interagit avec STAT1, STAT2 et TYK2 et bloque la phosphorylation de ces trois protéines ^{523,525–529}.

Après transfection des plasmides codant pour GFP-ORF1 et GFP-PCP, un effet modéré sur l'entrée de STAT1 dans le noyau a été observé par IF (Figure 29). Cependant, cet effet n'a pas été reproduit dans les expériences d'IF après transfection des plasmides codant pour FLAG-PCP et FLAG-ORF1 (Figure 30). De plus, aucun effet du domaine PCP n'a été observé sur le niveau de phosphorylation de STAT1. Il est possible, du fait du faible niveau d'expression de l'ORF1 et du domaine PCP, en comparaison du domaine MetPCP, détecté dans la plupart des immunoblots réalisés, que l'effet sur la phosphorylation de STAT1 soit masqué ou bien que l'ORF1 et le domaine PCP n'aient pas d'activité sur la voie de signalisation JAK-STAT et que l'effet observé par microscopie sur l'entrée de STAT1 dans le noyau soit non-spécifique. Il serait intéressant de transférer une quantité de plasmide codant pour l'ORF1 ou le domaine PCP plus importante ou d'augmenter le temps de transfection afin d'améliorer le niveau d'expression des protéines et donc de déterminer si une meilleure expression permettrait de visualiser un effet inhibiteur sur l'état de phosphorylation de STAT1 en immunoblot.

Dans les investigations menées pour identifier l'étape en amont de la phosphorylation de STAT1 qui pourrait être inhibée par MetPCP, il n'a pas été observé d'inhibition de la phosphorylation de JAK1, ni celle de STAT2. Cependant, des résultats préliminaires laissent supposer que la phosphorylation de TYK2 pourrait être diminuée. Les niveaux endogènes des protéines TYK2 et JAK1 étant faibles, ces résultats sont délicats à reproduire. Il est envisageable de les surexprimer afin de mieux visualiser une potentielle inhibition de la phosphorylation de ces protéines par MetPCP. Par ailleurs, la surexpression des protéines JAK1 et TYK2 pour stimuler la voie de signalisation au lieu de l'ajout d'IFN- β permettrait de confirmer si l'inhibition a lieu avant ou après l'activation de ces deux protéines ou au niveau de l'activation de STAT1 spécifiquement.

Par ailleurs, après stimulation des cellules avec l'IFN- γ , nous avons observé que la phosphorylation de STAT1 n'est pas inhibée par le domaine MetPCP, suggérant que l'inhibition de la phosphorylation est spécifique de la voie de réponse à l'IFN-I. La voie de réponse à l'IFN- γ ne dépendant pas de la phosphorylation de TYK2, une hypothèse serait que l'inhibition spécifique de la voie de réponse à l'IFN- β vient de l'inhibition spécifique de la phosphorylation de TYK2. Cependant, cette hypothèse reste encore à confirmer.

Nos résultats montrent que le domaine MetPCP du HEV inhibe l'activité du promoteur ISRE et la phosphorylation de STAT1. Cet effet inhibiteur n'a pas été observé pour le domaine PCP seul, ce qui pourrait suggérer que le domaine Met ou Y sont nécessaires à l'inhibition de cette voie. Cependant, les domaines Y, Met, MetY et YPCP exprimés séparément n'ayant pas d'effet sur l'activité du promoteur ISRE, cela suggère que c'est l'ensemble des domaines Met, Y et PCP qui est nécessaire à l'activité inhibitrice sur la voie de signalisation JAK-STAT. Il est également possible que seules les domaines Met et PCP soient nécessaires. Il serait intéressant d'exprimer les deux protéines en même temps afin d'analyser si une inhibition de l'activation du promoteur ISRE est observée dans ce cas là.

Dans une autre étude, il a été rapporté que le domaine Met d'un HEV-1 possède un domaine en doigt de zinc entre les acides aminés 73 et 94 ¹⁰⁴. Dans cette même étude, une protéine codant pour le domaine MetPCP (entre les acides aminés 26 à 592) a été produite en système *E. coli*. Cette protéine a été mise en contact avec différents substrats fluorescents, l'ubiquitine-7-amino-methylcoumarin (Ub-AMC), l'ISG15-AMC, le Nedd8-AMC et le SUMO-AMC, et a été capable d'hydrolyser les 4 substrats, mais l'hydrolyse de l'ISG15-AMC était la plus élevée. Chez d'autres virus, un domaine en doigt de zinc a été montré comme nécessaire à l'activité enzymatique de domaines PCP. Par exemple, le domaine en doigt de zinc de la protéine Nsp1- α du PRRSV est essentiel à l'inhibition de la production d'IFN- β ⁵⁶⁵. En effet, la protéine non structurale du PRRSV Nsp1- α possède un domaine PCP, un domaine en doigt de zinc en N-terminal du PCP et un domaine en doigt de zinc en C-terminal du PCP. Il a été montré que des mutations dans le domaine en doigt de zinc N-terminal inhibaient l'activité inhibitrice sur la voie de production de l'IFN- β de Nsp1- α , suggérant que ce domaine est essentiel à cette activité ⁵⁶⁶. Au contraire, des mutations au niveau des sites catalytiques permettant l'activité protéase du PCP ne modifiait pas l'activité inhibitrice de Nsp1- α sur la voie de production de l'IFN- β . Il serait intéressant de muter le domaine en doigt de zinc du domaine MetPCP du HEV (séquence NEVEQYCRARAGRCLEVGAHPR prédite à partir du logiciel SMART), et plus particulièrement les sites C79, C86 et H92, importants pour la liaison au zinc, afin de voir s'ils sont nécessaires à l'inhibition de la phosphorylation de STAT1. De la même manière, il serait intéressant de voir si une fonction de déISGylation des protéines est également portée par le domaine PCP seul ou s'il a besoin du motif en doigt de zinc pour exercer cette fonction.

Un des mécanismes pouvant conduire à une inhibition de la phosphorylation de STAT1 et potentiellement de TYK2 serait la liaison directe du domaine MetPCP avec une des protéines de la voie, bloquant ainsi son activité. Le domaine MetPCP pourrait se lier à JAK1 et/ou TYK2 pour bloquer leur activité de phosphorylation de STAT1. Il pourrait également se lier à STAT1 lui-même pour empêcher son recrutement au niveau de l'IFNAR et donc sa phosphorylation. L'étude de l'interaction du domaine MetPCP avec des protéines de la voie JAK-STAT a été débutée pendant cette thèse (voir travaux complémentaires, partie I).

Une autre hypothèse possible serait l'activation, par le domaine MetPCP, de phosphatases PTPs (pour *protein tyrosine phosphatases*), qui régulent négativement la voie JAK-STAT. Par exemple, la protéine cellulaire SHP2 (pour *SH2-domain-containing-PTPs*) est impliquée dans la déphosphorylation de STAT1 au niveau de résidus tyrosine et sérine, à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Il a été également montré que certaines PTP, comme TC45, déphosphorylent STAT1 dans le noyau. De même, la phosphatase TCPTP (pour *T-cell PTP*) est impliquée dans la déphosphorylation de STAT1 et de STAT3 dans le cytoplasme ³⁷⁹. Certains virus sont capables de moduler l'activité des PTPs pour inhiber l'activité des protéines de la voie JAK-STAT. Notamment, la protéine NS5 du JEV inhibe la phosphorylation de TYK2 et STAT1 via un mécanisme dépendant des PTPs ⁵⁶⁷. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur des PTPs, ATPase et phosphatase alcaline à large spectre, le sodium orthovanadate, restaure l'état de phosphorylation de STAT1 et TYK2 dans les cellules exprimant la protéine NS5. Cependant, la PTP impliquée n'a pas été identifiée. Il serait donc intéressant de traiter nos cellules exprimant le domaine MetPCP avec du sodium orthovanadate, afin de déterminer si l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 est liée à une PTP.

Une autre possibilité serait que le domaine MetPCP inhiberait l'activité de la protéine RACK1. RACK1 est une protéine adaptatrice permettant le recrutement de STAT1 (et non STAT2 et STAT3) au niveau d'IFNAR2 ⁵⁶⁸. Une fois phosphorylée, STAT1 se dissocie de RACK1 pour entrer dans le noyau et activer le promoteur ISRE. En effet, RACK1 est associé uniquement avec la forme non phosphorylée de STAT1. De nombreuses protéines virales interagissent avec RACK1. C'est le cas de la protéine E1A de l'Adenovirus 5 (Ad5) ⁵⁶⁹ qui interagit avec RACK1 au niveau de membranes périnucléaires dans la cellule. C'est également le cas de la protéine BZLF1 de EBV ⁵⁷⁰, de la protéine de matrice du IAV ⁵⁷¹ et de la protéine Nef du VIH-1