

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Caroline CHARLIER

Le mercredi 18 septembre 2013

Titre :

ANALYSE DU TRANSPORT INTRACELLULAIRE DU BORNAVIRUS

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Microbiologie

Unité de recherche :

INSERM UMR 1043 - CNRS UMR 5282

Directeur(s) de Thèse :

Daniel DUNIA - Cécile MALNOU

Rapporteurs :

Danielle BLONDEL - Sara SALINAS - Noël TORDO

Autre(s) membre(s) du jury :

Denis HUDRISIER

« Vas-y, fonce, on sait jamais, sur un malentendu ça peut marcher. »

Michel Blanc

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
SUMMARY	15
RESUME	17
LISTE DES ABREVIATIONS	21
LISTE DES FIGURES	25
INTRODUCTION	29
I- LE VIRUS DE LA MALADIE DE BORNA	31
A- Introduction.....	31
B- Génome du Bornavirus.....	37
1- Organisation génomique	37
2- La génétique inverse	37
C- Particules et protéines virales.....	47
1- Particule virale.....	47
2- Les protéines virales	47
D- Cycle viral.....	55
1- Entrée du virus et adressage au noyau.....	55
2- Réplication et transcription virale	57
3- Assemblage, relargage et dissémination	59
II - LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE	63
A- Le cytosquelette et ses moteurs.....	63
1- Les filaments d'actine.....	63
2- Les microtubules	69
B- Le transport axonal.....	77
1- Généralités	77
2- Transport des pathogènes par fixation directe au moteur.....	81
3- Transport du cargo par l'intermédiaire d'une vésicule.....	85
OBJECTIFS DE LA THESE	95
MATERIELS ET METHODES	101

I- Culture de neurones.....	103
II- Production de BDV.....	105
III- Marquage des endosomes axonaux avec le fragment Hc de TeNT ou la sous unité B de la toxine cholérique (CT-B)	107
IV- Immunofluorescence	107
V- Préparation des extraits neuronaux.....	109
VI- Immunoprécipitation.....	111
VII- Tri des endosomes par FACS	113
VIII- Gels de protéines et immunodétection (Western blot).....	113
RESULTATS	115
I- Analyse du trafic intracellulaire du BDV en utilisant un virus codant pour une phosphoprotéine couplée avec un motif tétracystéine.....	117
II- Analyse du transport axonal du BDV	129
1- Etudes de colocalisation entre le BDV et les endosomes axonaux.	131
2- Immunoprécipitation des endosomes axonaux.	133
3- Purification des endosomes axonaux par cytométrie en flux.	139
DISCUSSION	143
I- Etude du trafic intracellulaire du BDV	145
II- Analyse du transport axonal du BDV	157
III- Conclusions	165
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	167

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail et en particulier Mr Denis Hudrisier, qui a accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Mme Danielle Blondel, Mme Sara Salinas et Mr Noël Tordo d'avoir pris en charge la tâche d'être rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie d'avoir consacré du temps pour lire, évaluer et critiquer mon travail.

Après 4 ans et 8 mois passés au CPTP voici venu le temps des remerciements. Les manip auront eu raison de moi ! Je quitte donc la recherche avec pour seul regret celui de ne plus vous voir tous les jours.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Daniel Dunia. Merci de m'avoir accueillie dans ton équipe quand j'étais encore toute petite ! J'ai eu la chance de pouvoir bénéficier de tes grandes connaissances sur le Bornavirus et sur la virologie en général. Merci de m'avoir guidée dans mes recherches et de m'avoir fait confiance pour mener mon projet de thèse.

Je me souviendrai de ton gâteau au chocolat pour ma première manip d'imagerie réussie et du PBS 10X bien sur !

Je garderai un excellent souvenir de mon passage dans l'équipe, des pauses gourmandes, des fous rires, des râleries de chacun ! J'ai été ravie d'en faire partie et de représenter autant que possible le SUD.

Cécile c'est toi qui m'a appris à faire mes premières manips et il y a quelques semaines c'est moi qui t'ai montré comment faire mes manips, la boucle est bouclée...Je tiens sincèrement à te remercier pour tout : ta patience, ta pédagogie et ton soutien moral quand les manips ne marchaient pas ! Tu as su me booster et me féliciter quand c'était mérité. J'ai beaucoup appris à tes côtés, notamment à présenter clairement mes résultats (je n'oublierai jamais qu'il faut faire « comme si je parlais à ma grand mère ») mais aussi que les WB et les IF sont flexibles, que « l'agenda c'est la vie », que Montpellier c'est mieux que Toulouse, que voyager c'est super et que twilight c'est pour les ados...

Tu vois que c'est possible de finir une thèse sans se fâcher avec sa chef ! J'ai été ta première thésarde, tu as donc intérêt à ne pas m'oublier ! J'aurai eu la chance de participer à tous les moments forts de ta vie : la naissance de Choupipe, l'achat de ta maison et maintenant ton mariage. Il s'en est passé des choses en 4 ans !

Un énorme merci à ma mimi chérie. Tu es géniale ! On s'est aimées dès le départ, nous sommes maintenant amies dans la vraie vie. Ça va énormément me manquer de ne plus te voir tous les jours, de ne plus être au courant de tous les petits détails de ta vie... Heureusement la fin du labo ne signifie pas la fin des soirées filles et des « Mimi's » ! Je nous félicite d'avoir réussi à quitter toutes les deux le labo en même temps!

Merci à la plus belle, la plus géniale et la plus blonde : Princesse Choupette Anne (c'est bien comme ça que tu voulais que je le dise ?). Plus sérieusement, merci pour ton soutien précieux lors des coups durs de la vie privée et du labo, tu as souvent été une oreille attentive. Merci aussi pour tous les fous rires (Débile Débile Débile). La course pour aller aux toilettes va beaucoup me manquer !

Marionnette même si nous n'étions pas parties sur de très bonnes bases nous nous sommes bien rattrapées cette dernière année, c'est bien ça l'essentiel ! Je te souhaite tout plein de bonnes choses et entre autre un vrai poste de chercheur, car s'il y en a bien une faite pour ça, c'est toi !

Petite Emilie tu es maintenant la « vieille » thésarde ! Je compte sur toi pour embêter régulièrement Anne ! Je pensais être râleuse mais j'ai trouvé mon maître, surtout ne change pas.

Petite Cécile, la relève est assurée. Comme on dit « on sait ce que l'on perd mais on ne sait pas ce que l'on gagne » ☺ ! Je pense qu'à côté de toi j'étais un ange ! J'espère que tu ne vomiras pas trop durant ces 3 années (minimum !) de thèse et que « tu ne finiras pas comme moi »...

Merci aux DGD garçons passés et présents Grégoire, Alexandre et Amine. Amine merci de m'avoir supportée, ça n'a pas du être tous les jours facile d'être dans le bureau des filles !

Un grand grand merci à Sophie, qui m'a fait l'honneur d'être ma marraine de thèse. Tu auras fait preuve d'un soutien sans faille durant ces 3 années de thèse ! Merci pour TOUT mais aussi de m'avoir transmis une toute petite partie de tes connaissances en imagerie.

Merci Striiiiid pour les pauses thés, les mille feuilles, les barbucs! Tu es trop choukiki de l'extrême ! Et vive la biostation !

Merci aux membres des 4 fantastiques, aussi appelé « Elite »: Gavinou, Lolo et Johan ! J'ai été ravie d'être la seule fille du groupe, vous m'avez bien chouchoutée. Vous avez toujours été là pour faire la fête mais aussi dans les coups durs... Nous avons survécu au M2 et moi à la thèse (pour vous ce n'est pas encore gagné) !

Merci à ma Pioupiou, ancien membre des M2 ! Ton départ lors du début de la thèse aura été difficile mais heureusement nous avons réussi à garder contact et à nous voir régulièrement !

Merci ma Lili chérie ! Nous sommes arrivées en même temps au labo, il a déjà 4 ans et demi, tu parlais italien et anglais, et moi français et ... français ! Tu nous as apporté une petite touche d'Italie ! Continue à bien « anesthésier tes souris »! Tes entrées spontanées dans le bureau suivies de la fermeture de la porte vont énormément me manquer et les « pipi, ordi, parti » aussi !

Un énorme merci à toutes les filles du midi : FLO (la corse refoulée), Nadège, les Virginie's, Caroline, Charlotte, Cécile, Lili, Myriam et maintenant Florence et Emilie et à Christophe aussi, qui en a sûrement beaucoup appris sur les filles pendant les repas ! C'était tellement chouette de vous retrouver entre midi et deux ! Qu'est ce que vous allez me manquer, les fous rires, les potins, les gaffes, les pique-niques à la piscine, les « je n'ai pas entendu », les cookies du relais H...

Vous avez fait preuve d'un soutien sans faille, toujours là pour me remonter le moral et dire des conneries!

Les filles il va falloir penser à recruter, le « groupe des filles du midi » commence à diminuer !

Vous allez énormément me manquer, j'espère que nous continuerons à nous voir !

Caro, avec qui vas tu faire tes « réunions escalier »?

Merci à tous les compagnons de V&B, de fous rires et de discussion dans les couloirs de l'étage vert, que je n'ai pas encore remercié : Audrey, Christina, Raphaël, Béa (madame Haribo), CC, Lulu, Fanny, Sahar, Isabelle, Guillaume, Hélène, Nora, Myriam, Anne, Lyse et Sabine.

Merci à Perrine et Céline pour nos petits repas au Saint Florent !

Je tiens à remercier aussi Roland Liblau, Abdel Saoudi, Nicolas Blanchard, Renaud Lesourne, Anne Dejean, Lennart Mars et David Brassat pour leurs remarques pertinentes durant les réunions de labo du mercredi. J'aurai appris qu'il manque toujours des contrôles ! Abdel et Anne vous avez même réussi à me séparer de mon microscope et à me faire faire de la cytométrie ! Abdel j'attends toujours ton gâteau !

Merci aux filles de la cytométrie d'avoir accepté de relever le défi de trier des petites particules ! Si nous y sommes arrivées c'est en grande partie grâce à vous !

Merci Nicolas de m'avoir supportée, consolée, remotivée et écoutée râler pendant ces 3 années de thèse ! Je pense cependant que la fin de la thèse ne signifie pas la fin de tout ça ! Nous partons maintenant vers une nouvelle aventure mais je suis rassurée de le faire à tes côtés.

Un énorme merci à toute ma famille, mes parents, ma sœur et mes frères ainsi que mes neveux et nièces. Vous me soutenez dans tous les moments de ma vie et êtes toujours là !

SUMMARY

Borna disease virus (BDV), a highly neurotropic and non-cytolytic virus, differs from other *Mononegavirales* by its nuclear site for replication and transcription. The cellular cycle of Bornavirus remains poorly understood, in particular concerning the modalities of intracellular transport of viral ribonucleoparticles (RNP). During my Ph.D., I developed several approaches aiming at a better understanding of the modalities of BDV transport, in persistently infected cells as well as in neurons.

To track RNP transport in live, infected cells, we constructed a recombinant virus in which a tetracysteine tag was fused to the BDV phosphoprotein (P). Upon rescue and characterization of this recombinant virus, we analyzed viral dynamics in persistently infected cells using live imaging. This analysis revealed that nuclear vSPOTs (viral speckle of transcripts), the viral replication sites, were very static. We thus performed FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) and FLIP (Fluorescence Loss Induced by Photobleaching) experiments, which revealed that one fraction of P protein is very static in vSPOTs, suggesting interaction with cellular partners, whereas another fraction of P is highly mobile and exchanged between all cellular compartments. In coculture experiments, we also observed the early steps of BDV infection by live confocal imaging and visualized viral transfer from cell to cell and its transfer to the nucleus.

We also studied the molecular mechanisms of BDV transport in primary cultures of neurons. We hypothesized that BDV may be transported by specialized vesicles called axonal endosomes, similarly to other viruses and toxins such as canine adenovirus and tetanus toxin (TeNT). Immunofluorescence analysis of the colocalization between BDV phosphoprotein or nucleoprotein and TeNT and biochemical purifications of enriched fractions of axonal endosomes showed that RNPs are indeed transported in these axonal endosomes. These results will be complemented by content analysis of axonal endosomes purified by flow cytometry, a novel approach which is still under development.

Taken together, my results have contributed to a better understanding of BDV transport and open new perspectives for a better characterization of BDV cellular cycle.

RESUME

Le Bornavirus (BDV) est un virus neurotrope à réplication non cytolitique, qui se distingue des autres *Mononegavirales* par une réplication et une transcription du génome viral strictement nucléaires. A l'heure actuelle, le cycle cellulaire du BDV est assez mal caractérisé, en particulier en ce qui concerne les modalités du transport intracellulaire des complexes de réplication viraux ou ribonucléoparticules (RNP), ce qui a fait l'objet principal de mes travaux de thèse.

Afin de visualiser le transport des RNP dans les cellules infectées, nous avons construit un virus recombinant pour lequel la phosphoprotéine P (une des protéines virales composant les RNP) porte un motif tétracysteine (TCT) capable de fixer un réactif qui devient alors fluorescent. Après mise au point des conditions de marquage, nous avons analysé la dynamique virale dans des cellules infectées de façon persistante par imagerie confocale en temps réel. Cette analyse a révélé que les vSPOT, les sites de réplication et de transcription du BDV, étaient extrêmement statiques. L'analyse plus approfondie de la dynamique de la P par des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) et de FLIP (Fluorescence Loss Induced by Photobleaching) montrent qu'une fraction de protéine P est en fait très mobile et constamment échangée entre les compartiments cellulaires. Au sein de ces structures punctiformes nucléaires, une fraction de la protéine P est beaucoup plus statique, suggérant qu'elle est en interaction avec un ou plusieurs partenaires cellulaires. Des expériences de coculture nous ont également permis d'observer les étapes précoces de l'infection par imagerie confocale en temps réel et de visualiser le transfert du virus d'une cellule à l'autre, son entrée dans la cellule et son transport jusqu'au noyau.

Nous avons ensuite étudié le transport axonal du BDV dans des cultures primaires de neurones. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le BDV serait transporté par des vésicules spécialisées, les endosomes axonaux, un système utilisés par d'autres virus et toxines comme l'adénovirus canin et la toxine tétanique (TeNT). Les études de colocalisation entre la phosphoprotéine ou la nucléoprotéine du BDV et des cargos connus de ces endosomes comme la TeNT, et les purifications biochimiques de fractions enrichies en endosomes axonaux montrent

que les RNP sont bien transportées par les endosomes axonaux. Ces résultats seront complétés par la recherche des divers constituants du virus dans des fractions d'endosomes axonaux purifiés par cytométrie en flux, une approche technique nouvelle qui est encore en développement.

Mes travaux de thèse ont donc permis une meilleure connaissance des modalités du transport du BDV, ouvrant de nouvelles perspectives pour une meilleure caractérisation du cycle cellulaire de ce virus.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
ADNc : AND complémentaire
ARN : AcideRiboNucléique
ARNm : ARN messenger
Arp 1 : Actin-Related Protein
ATP : Adénosine TriPhosphate
BB : Breaking Buffer
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
BDV : Bornavirus
BSA : Bovine Serum Albumin
CAP : Capping Actin Protein
CAT : Chloramphénicol Acétyl Transférase
CAR : Coxsackievirus and Adenovirus Receptor
CAV-2 : Adénivirus Canin
CKII : Caséine Kinase II
CT : Cholera Toxin
DAPI : 4',6-DiAmidino-2-Phénylindole
DLC8 : Dynein Light Chain 8
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNCL2B : Dynein Light Chain 2B
FLIP : Fluorescence Loss Induced by Photobleaching
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching
G : Glycoprotéine
GABARAP : récepteur à l'acide gamma amino butyrique A
GAPDH : GlycerAldehyde-3-Phosphate DéHydrogénase
GFP : Green Fluorescent Protein
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
GTP : Guanosine Triphosphate
HBSS : Hanks Buffered Salt Solution
HEPES : HydroxyEthyl PiperazineEthaneSulfonic
HMGB1 : High-mobility group protein B1

Hsc70 : Heat Shock cognate 70
HSV : Herpes Simplex Virus
IP : ImmunoPrécipitation
L : Polymérase
M : Protéine de matrice
MT : MicroTubule
N : Nucléoprotéine
NACHR : récepteur nicotinique à l'acétylcholine
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NCR : Non-Coding Region
NES : Nuclear Export Signal
NGF : Nerve Growth Factor
NLS : Nuclear Localisation Signal
P : Phosphoprotéine
PBS : Phosphate Buffered Saline
PKC : Protéine Kinase C
RE : Réticulum Endoplasmique
RIG-I : Retinoic acid Inducible Gene I
RNP : RiboNucléoParticule
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SNARE : Soluble NSF Attachment Protein REceptor
SNC : Système Nerveux Central
SVF : Sérum de Veau Foetal
TBS : Tris-Buffered Saline
TBK1 : TANK Binding Kinase
TCT : TétraCystéine Tag
TeNT : Toxine Tétanique
TLR : Toll Like Receptor 3
TrkB : Tyrosine Kinase B
vSPOT : Viral Speckle Of Transcripts
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Particule de Bornavirus visualisée en microscopie électronique, après coloration négative.

Figure 2 : Organisation génomique du Bornavirus

Figure 3 : Principe des constructions de génétique inverse utilisées pour l'étude du Bornavirus.

Figure 4 : Représentation schématique d'une particule de Bornavirus

Figure 5 : Carte des motifs identifiés au sein des protéines N, P et X du BDV.fi

Figure 6 : Cycle viral

Figure 7 : Hypothèse sur le mécanisme de passage de la membrane nucléaire par la RNP du BDV

Figure 8 : Hypothèses sur le mécanisme de passage du BDV d'un neurone à l'autre.

Figure 9 : Organisation du cytosquelette d'actine et des microtubules dans les neurones.

Figure 10 : Structure et dynamique des filaments d'actine.

Figure 11 : Structure de la myosine.

Figure 12 : Structure des microtubules.

Figure 13 : Organisation des microtubules dans une cellule classique et dans une cellule neuronale.

Figure 14 : Structure des kinésines, dynéines et dynactines.

Figure 15 : Coordination des kinésines et dynéines

Figure 16 : Les différentes catégories de transport axonal

Figure 17 : Transport axonal des virus et toxines.

Figure 18 : Représentation schématique d'une particule virale d'Herpes Simplex Virus.

Figure 19 : Site d'action et transport de la TeNT

Figure 20 : Structure de la TeNT et du fragment Hc.

Figure 21 : Endocytose de la TeNT couplé au transport axonal rétrograde dans les neurones moteurs.

Figure 22 : Représentation schématique d'une particule virale du virus de la rage.

Figure 23 : Principe du marquage FIAsh

Figure 24 : Etude de la colocalisation entre les protéines N et P du BDV et le fragment Hc de TeNT.

Figure 25 : Etude de l'interaction entre les protéines virales ou Rab7 et TrkB.

Figure 26 : Etude de la présence des protéines virales dans des fractions enrichies en endosomes axonaux immunoprécipitées avec un anticorps anti-panTrk.

Figure 27: Etude de la présence des protéines virales dans des fractions purifiées au trieur

Figure 28 : Culture de neurones corticaux de rat dans des chambres microfluidiques.

Figure 29 : Particules de BDV ou de VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1) purifiées et marquées avec le réactif FIAsh.

Figure 30 : Coculture entre les cellules Vero rBDV-P-Flag-TCT et les neurones corticaux.

INTRODUCTION

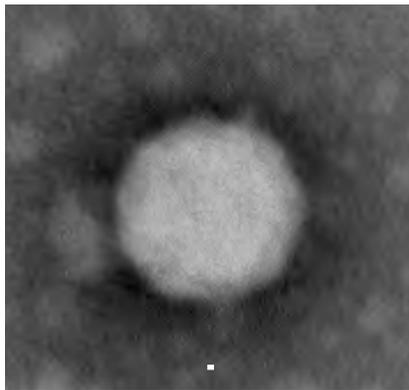


Figure 1 : Particule de Bornavirus visualisée en microscopie électronique, après coloration négative.

Cette photo a été prise au plateau technique du Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie, à Toulouse. Barre = 100 nm.

I- LE VIRUS DE LA MALADIE DE BORNA

A- Introduction

Dès le XVIIIème siècle, des traités de médecine vétérinaire allemands font référence à une maladie neurologique affectant de manière sporadique les chevaux et les moutons du sud-est de l'Allemagne (von Sind 1767). Ce n'est qu'un siècle plus tard, en 1895, que l'étiologie infectieuse de cette maladie sera reconnue, à l'occasion d'une épidémie touchant les chevaux d'un régiment de cavalerie allemande aux environs de la ville de Borna (Ludwig and Bode 2000). L'agent infectieux sera finalement identifié et appelé virus de Borna, ou Bornavirus (Borna Disease Virus ou BDV en anglais ; Figure 1).

Les analyses moléculaires ont permis de démontrer que le BDV est un virus enveloppé dont le génome est composé d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité négative non segmentée, conduisant à sa classification au sein de l'ordre des *Mononegavirales* (Briese, Schneemann et al. 1994; Cubitt and de la Torre 1994). Il fait donc partie du même ordre que les virus de la stomatite vésiculeuse et de la rage (*Rhabdoviridae*), le virus de la rougeole (*Paramyxoviridae*), et les virus d'Ebola et de Marburg (*Filoviridae*). Le Bornavirus se distingue des autres *Mononegavirales* par ses sites de transcription et de réplication localisés dans le noyau cellulaire. Il a donc été classé dans une nouvelle famille : les *Bornaviridae*. Ce virus présente un tropisme préférentiel pour les neurones, même s'il est capable d'infecter de nombreux types cellulaires *in vitro*, tels que les cellules Vero (cellules épithéliales de rein de singe). Grâce à sa capacité à se multiplier sans provoquer de lyse cellulaire, le Bornavirus persiste durant toute la vie de la cellule tout en se répliquant de manière efficace.

La distribution géographique du BDV semble être mondiale, même si le foyer principal d'infection est situé en Europe Centrale (Ludwig and Bode 2000; Dauphin, Legay et al. 2002). Le virus a été également détecté au Japon et en Finlande

(Kinnunen, Billich et al. 2007). Les mécanismes de transmission du BDV sont encore mal compris. Dans les fermes, le BDV peut infecter les animaux après des contacts prolongés les uns avec les autres. Dans certaines situations de persistance du BDV, de faibles quantités de virus sont présentes dans les urines, favorisant ainsi le passage horizontal du virus (Sauder and Staeheli 2003). La transmission materno-fœtale a également été démontrée dans de rares cas (Okamoto, Hagiwara et al. 2003).

Le BDV présente un spectre d'hôte très large. En effet, des infections naturelles ont été mises en évidence dans un grand nombre d'espèces animales mammifères, parmi lesquelles les chevaux, les moutons, le chat, le chien, et plus récemment le macaque (Hagiwara, Tsuge et al. 2008) et les rongeurs sauvages. Par ailleurs, des infections expérimentales ont été réalisées dans de très nombreuses espèces de vertébrés, allant du poulet au macaque rhésus en passant par la souris et le rat (Ludwig and Bode 2000). Ce spectre d'hôte s'est encore élargi avec la découverte récente de l'intégration de séquences apparentées à celle de la nucléoprotéine du BDV dans le génome de nombreuses espèces animales ainsi que dans le génome humain (Horie, Honda et al. 2010). Cependant, les conséquences de l'infection par le BDV chez l'homme reste un important sujet de controverse. En effet, même si le BDV a été isolé à partir de matériel d'autopsie de cerveaux humains (de la Torre, Bode et al. 1996; de la Torre, Gonzalez-Dunia et al. 1996), il est à ce jour impossible d'établir un lien de causalité entre l'infection par le BDV et des maladies psychiatriques humaines comme la schizophrénie, les syndromes bipolaires ou encore l'autisme, notamment à cause de l'absence de méthodes diagnostiques fiables et standardisées (Chalmers, Thomas et al. 2005).

Quelle que soit l'espèce animale, le BDV est responsable d'une infection du système nerveux central, avec un tropisme préférentiel pour les structures limbiques du cerveau telles que l'hippocampe et le cortex, et peut causer des signes cliniques extrêmement variés. L'infection peut le plus souvent passer inaperçue et rester asymptomatique, ou peut conduire à des symptômes allant de troubles du comportement divers à une méningo-encéphalite mortelle. L'expression clinique de la maladie dépend de l'espèce considérée, mais varie également en fonction de l'âge et du statut immunitaire de l'hôte (Ludwig and Bode 2000).

Le modèle animal le plus couramment utilisé pour l'étude des mécanismes physiopathologiques induits par l'infection par le BDV est le rat Lewis. En effet, l'infection du rat Lewis présente de grandes similitudes avec les infections des hôtes naturels. Les conséquences cliniques de l'infection varient en fonction de l'âge auquel l'animal est infecté. Chez le rat adulte immunocompétent, l'infection aboutit à une méningo-encéphalite sévère liée à la réponse immune dirigée contre les neurones infectés. Cette maladie présente des caractéristiques très similaires à celles rencontrées lors de l'infection naturelle du cheval. L'infection des rats nouveaux nés, quant à elle, n'entraîne pas d'activation de la réponse immunitaire. Elle se caractérise par la survenue d'une maladie neuro-développementale associée à des troubles du comportement moteur, social ou de la cognition. Des résultats récents suggèrent que la susceptibilité est variable en fonction des souches de rat utilisées (Wu, Schulz et al. 2013).

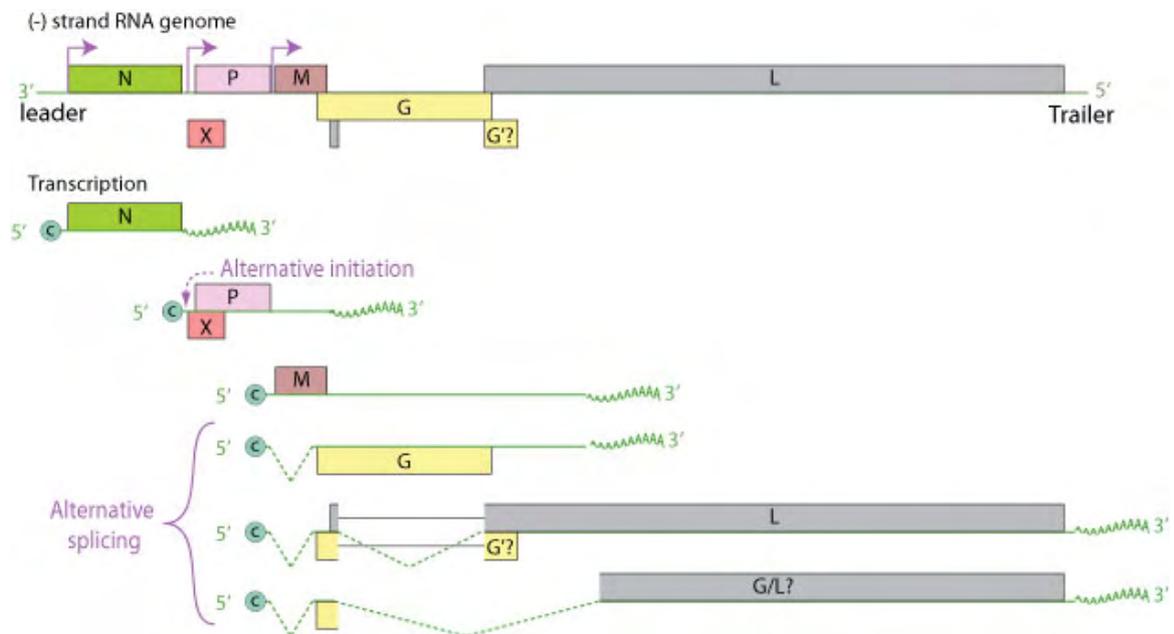


Figure 2 : Organisation génomique du Bornavirus

Les positions approximatives des phases ouvertes de lectures correspondant aux différentes protéines du BDV sont indiquées en haut de la figure. Les séquences signal d'initiation de la transcription sont indiquées sur le génome par les flèches roses.

Une fois que les différents ARN sont synthétisés, ils sont épissés, coiffés et polyadénylés comme les autres ARNm cellulaires.

Schéma issu de ViralZone

B- Génome du Bornavirus

1- Organisation génomique

Le génome du BDV est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité négative non segmentée, d'environ 8,9 kb. C'est le génome le plus compact de l'ordre des *Mononegavirales*. Comme pour tous les virus de cet ordre, il sert de matrice pour la synthèse d'ARN dans deux buts distincts : la transcription pour générer des ARNm subgénomiques et la réplication via la production d'anti-génome de polarité positive servant de support pour la génération de génomes de polarité négative.

L'organisation génomique du BDV est similaire à celle des autres *Mononegavirales* (Briese, Schneemann et al. 1994). Au moins six transcrits sont codés par le génome du BDV (Figure 2). En partant de l'extrémité 3' du génome, les transcrits codent dans l'ordre pour la nucléoprotéine p38/p40 (BDV-N), la phosphoprotéine p24/p16 (BDV-P), la protéine X p10 (BDV-X) traduite à partir d'un cadre de lecture chevauchant avec celui de la P, la protéine de matrice (BDV-M), la glycoprotéine d'enveloppe (BDV-GP) et l'ARN polymérase ARN dépendante p190 (BDV-L). Un septième transcrit a été identifié et il coderait pour p165, une isoforme de la polymérase L.

2- La génétique inverse

Une meilleure compréhension de la biologie du BDV passe par la possibilité de fabriquer des virus recombinants dans lesquels sont insérées des mutations sur les gènes codants pour les protéines que l'on souhaite étudier. Cette technique est appelée génétique inverse. La possibilité de manipuler les génomes des *Mononegavirales* a longtemps été compliquée par la nature ribonucléique de leur génome. Comme il n'existe pas d'ARN polymérase-ARN dépendante dans la cellule, il faut donc apporter la polymérase virale en *trans*. En outre, l'ARN nu des *Mononegavirales* n'étant pas infectieux, celui-ci doit être encapsidé sous la forme d'une ribonucléoparticule (RNP), contenant tous les constituants viraux requis pour la réplication, notamment la nucléoprotéine et la phosphoprotéine. Enfin, les extrémités

terminales du génome étant cruciales pour la réplication et la transcription, il faut s'assurer qu'elles soient précises au nucléotide près.

Dans le cas du BDV, un certain nombre de limitations ont longtemps compliqué la mise au point d'un système de génétique inverse. Tout d'abord, il existait une incertitude sur les extrémités génomiques du BDV, car les séquences des isolats connus du BDV ne montraient pas de complémentarité aux extrémités 3' et 5'. Ceci est étonnant pour un virus de l'ordre des *Mononegavirales*, car ces régions contiennent les séquences nécessaires à la réplication et doivent en général pouvoir s'apparier. Le développement de la génétique inverse pour le BDV permettra d'ailleurs de démontrer que ce génome doit effectivement être complémentaire pour être infectieux, mais qu'il est en fait activement tronqué dans la cellule au cours de l'infection. Ensuite, la composition protéique exacte de la RNP du BDV présentait une incertitude. Il existe en effet plusieurs isoformes de la N, de la P et de la L, menant à une grande variété de RNP possibles. Ceci pourrait d'ailleurs suggérer que différentes formes de RNP existent et présentent des activités transcriptionnelles différentes, bien qu'aucune donnée ne permette d'étayer cette hypothèse pour le moment. Enfin, le point le plus frappant, qui a permis d'obtenir un minigénome puis un clone complet infectieux, est la découverte que la stoechiométrie entre la N et la P est déterminante dans les phases précoces de l'infection. En effet, il a été montré qu'il était essentiel d'avoir un rapport N/P de 10 (suite à la transfection de dix fois moins de plasmide codant P que N), pour que l'on puisse obtenir un virus viable et qu'il suffit de variations mineures dans ce rapport pour que la génétique inverse soit non fonctionnelle (Schneider, Naegele et al. 2003). Ceci était d'autant plus étonnant que le rapport N/P est au plus égal à 2 dans une cellule infectée de façon persistante. Il semble d'ailleurs que le rapport N/P soit variable entre la phase aiguë et la phase persistante de l'infection (Watanabe, Zhong et al. 2000). Cette dépendance absolue d'un rapport N/P précis lors de l'infection explique vraisemblablement les raisons pour lesquelles les cellules infectées par le BDV sont réfractaires à la surinfection et qu'une résistance à l'infection puisse être obtenue par l'expression isolée d'une protéine virale comme la N ou la P (Geib, Sauder et al. 2003).

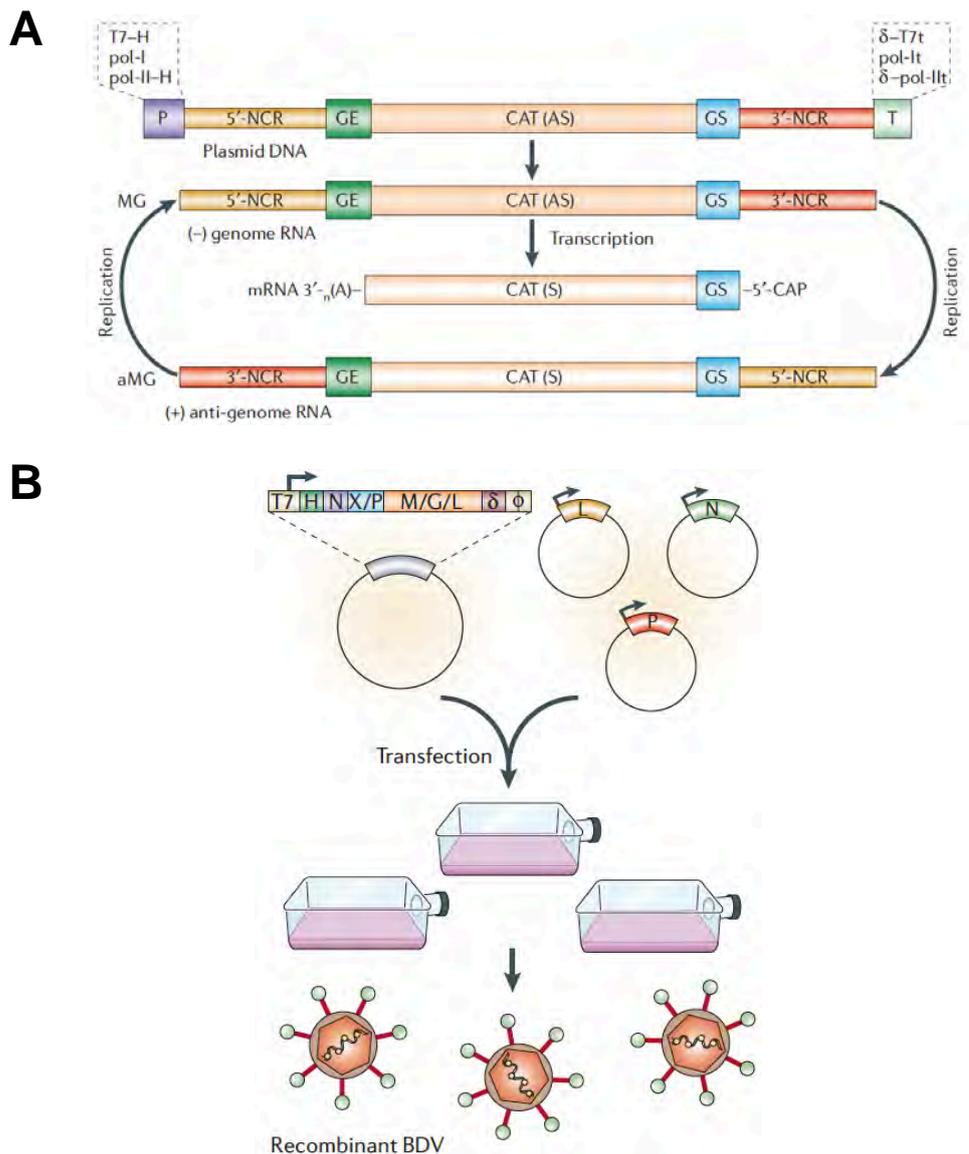


Figure 3 : Principe des constructions de génétique inverse utilisées pour l'étude du Bornavirus.

(A) Construction de type minigénome avec le gène rapporteur de la chloramphicol acétyl transférase (CAT). Sont représentées les formes sens (S) et antisens (AS) de la construction ainsi que les régions non codantes notées NCR, et les séquences de promotion et de terminaison de la transcription par le système cellulaire (notées P et T). Les régions d'initiation et de terminaison de la transcription du génome du BDV sont notées GS et GE respectivement.

(B) Principe de préparation de virus recombinants après transfection des vecteurs d'expression des protéines virales et du génome viral complet dans les cellules productrices.

Schéma issu de de la Torre, 2005

Construction du minigénome du BDV :

De façon générale, la première étape dans la construction d'un virus recombinant passe par le développement d'un système de minigénome ou miniréplicon, où le génome du virus est remplacé par un gène rapporteur (Figure 3 A).

Classiquement, le système du miniréplicon est constitué d'un plasmide contenant une séquence d'ADNc flanquée des signaux d'initiation et de terminaison de la transcription qui sont reconnus par la polymérase virale (notés GE et GS sur le schéma, Figure 3 A), ainsi que des régions non codantes (non-coding regions : NCR) en 5' et 3' retrouvées aux extrémités du génome du BDV (Perez, Sanchez et al. 2003; Schneider, Naegele et al. 2003). L'ADNc correspond généralement à un gène rapporteur comme la CAT (chloramphenicol acetyltransferase) ou la luciférase, disposé en orientation antisens dans le plasmide. La construction est également flanquée de signaux 5' et 3' d'initiation et de terminaison de la transcription reconnus par la polymérase qui sera utilisée (notés P et T sur le schéma, Figure 3 A). Plusieurs systèmes sont utilisés, certains dépendant de la polymérase II cellulaire, d'autre de la RNA polymérase du phage T7, qui est alors fournie en *trans*. A l'issue d'une première étape de transcription, le minigénome est produit sous forme d'ARN. Comme la réplication des *Mononegavirales* requiert des extrémités du génome précises au nucléotide près, on ajoute souvent dans ces plasmides une séquence codant un ribozyme, permettant un ajustement de ces extrémités. La réplication et la transcription du minigénome sont dépendantes de la présence conjointe des constituants de la RNP, les protéines L, N et P, qui sont exprimées à partir de plasmides transfectés avec celui du minigénome (Figure 3 B). Si tous ces éléments sont fournis à la bonne stoechiométrie et sont fonctionnels, l'expression du minigénome est révélée par celle du gène rapporteur.

Ces systèmes fournissent un moyen rapide de valider la fonctionnalité de l'approche choisie et sont très utilisés pour analyser les modalités de la réplication et de la transcription du virus. Les premières études ont par exemple montré que l'expression de la X n'était pas requise et qu'elle était même inhibitrice (Poenisch, Unterstab et al. 2004; Schneider, Blechschmidt et al. 2004).

Production de virus recombinants BDV :

Une fois que les expériences avec un minigénome ont permis de déterminer les conditions optimales, la totalité du génome du BDV peut-être insérée à la place du gène rapporteur dans un plasmide comportant tous les éléments cités précédemment (Figure 3 B) (Schneider 2005). Comme le BDV produit peu de particules virales libres, les cellules utilisées pour la transfection des divers plasmides requis pour la production de virus recombinants sont ensuite co-cultivées avec des cellules permissives pour l'amplification du virus neo-synthétisé.

Avancées récentes liées à la construction de virus recombinants par génétique inverse :

Comme pour tous les *Mononegavirales*, les systèmes de génétique inverse développés ces dernières années ont permis d'important progrès dans la compréhension des mécanismes de régulation de la réplication et de la transcription du BDV. Ils ont aussi permis de mieux comprendre la physiopathologie de cette infection et de préciser le rôle de certaines protéines virales dans la physiologie neuronale.

Les premières descriptions de systèmes fonctionnels de génétique inverse pour le BDV ont été accompagnées par la démonstration que le génome de ce virus était soumis à des phénomènes de troncation génomique active au niveau de ses extrémités (Schneider, Schwemmler et al. 2005). Ce phénomène fait actuellement l'objet d'études mécanistiques très poussées et sa signification biologique est aussi débattue. Il semble notamment que la troncation de l'extrémité 5' pourrait permettre au virus d'échapper à la détection par les senseurs de type RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene I) (Habjan, Andersson et al. 2008).

Par ailleurs, afin de comprendre le rôle de la phosphorylation de la protéine P par la protéine kinase C (PKC) dans la physiologie neuronale, un virus recombinant comportant des mutations pour les sites de phosphorylation de la P par la PKC a été construit. La comparaison de la physiologie des neurones infectés avec le virus recombinant sauvage et muté a permis de mettre en évidence que la protéine P et sa phosphorylation par la PKC étaient à l'origine des perturbations de la plasticité synaptique neuronale observées lors d'une infection par le BDV (Prat, Schmid et al. 2009).

Une autre étude, portant cette fois-ci sur la protéine X du Bornavirus, a permis de mettre en évidence l'importance de la localisation mitochondriale de la X dans son rôle anti-apoptotique (Poensch, Burger et al. 2009). En effet, un virus recombinant comportant une mutation sur le site de localisation mitochondriale de la X perd son effet anti-apoptotique.

Enfin, grâce à la génétique inverse, il a été possible de démontrer le rôle exact de certaines mutations dans l'adaptation du BDV à une nouvelle espèce. Il a ainsi été démontré qu'après un passage du BDV dans le cerveau de rats nouveaux nés puis trois passages dans celui de souris, le virus pouvait s'adapter pour se propager efficacement dans le cerveau des souris et induire une maladie neurologique. La génétique inverse a permis de montrer que cette adaptation est liée à deux mutations dans la polymérase virale et une dans son cofacteur, la protéine P (Ackermann, Staeheli et al. 2007).

Les autres intérêts de la génétique inverse sont de produire des virus atténués pour la vaccination ou des virus exprimant des protéines additionnelles destinés au transfert de gènes ou au suivi en temps réel de l'infection, notamment avec l'expression de protéines fluorescentes. Si la production de virus atténués pour la vaccination offre peu d'intérêt pour le BDV, le neurotropisme de ce virus pourrait offrir la possibilité de construire un vecteur permettant l'expression de protéines étrangères dans le système nerveux central (SNC) (Daito, Fujino et al. 2011). K. Tomonaga et son équipe ont ainsi construit un vecteur BDV recombinant dans lequel une unité additionnelle de transcription a été insérée au niveau d'une région intercistronique additionnelle insérée entre les protéines P et M. La séquence codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) a été insérée au niveau de cette cassette d'expression et a permis de suivre la progression de l'infection virale au sein d'une culture cellulaire, mais aussi dans le SNC de rongeurs durant de longues périodes et sans atténuation notable. Ce type de vecteur pourrait être utilisé comme traceur de circuits neuronaux ou permettre l'expression stable de gènes étrangers dans le SNC.

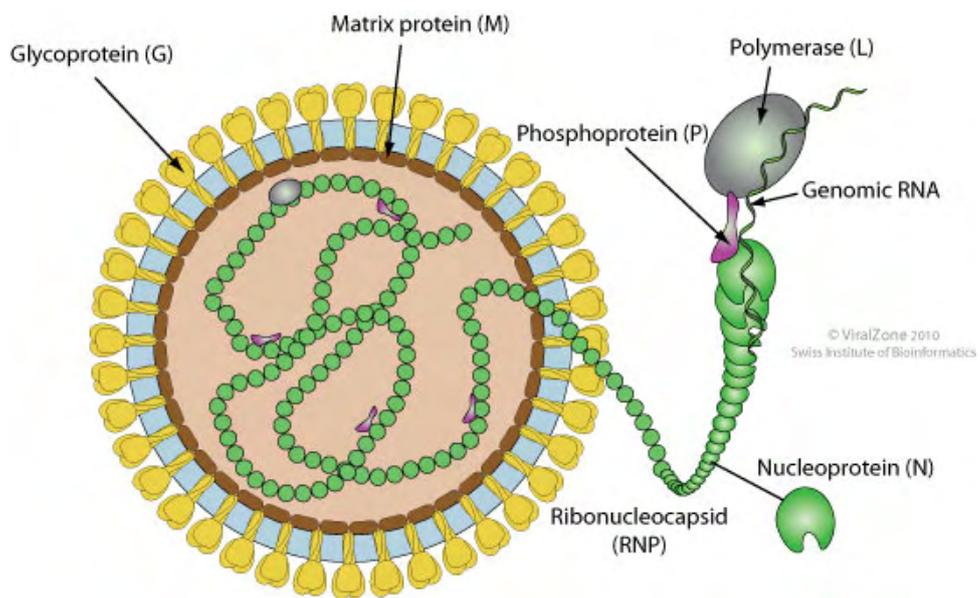


Figure 4 : Représentation schématique d'une particule de Bornavirus
Schéma issu de ViralZone

C- Particules et protéines virales

1- Particule virale

Les particules du BDV ont une taille comprise entre 80 et 120 nm (Figure 1 et 4). L'enveloppe virale est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle est enchâssée la glycoprotéine virale sous ses deux formes : gp84 et gp43. Sous l'enveloppe se trouve la protéine de matrice. A l'intérieur de la particule virale se trouve la ribonucléoparticule (RNP) aussi appelée complexe de réplication. Cette RNP est composée de l'ARN génomique et des protéines virales indispensables à la réplication : la nucléoprotéine, la phosphoprotéine et la polymérase.

2- Les protéines virales

La nucléoprotéine N :

La nucléoprotéine est la protéine virale la plus abondante. L'initiation de la traduction ayant lieu sur deux codons AUG distincts, deux isoformes de la N sont synthétisées, l'une d'un poids moléculaire de 40 kDa et l'autre de 38 kDa.

La N est indispensable à la formation des RNP puisqu'elle encapside le génome viral et s'associe aux protéines P et L.

De plus, grâce à sa capacité à interagir avec les histones, elle joue un rôle important dans la formation des usines de réplication et de transcription virales appelées vSPOT (Viral Speckle Of Transcripts) situées dans le noyau des cellules infectées, et présentes en interaction étroite avec la chromatine cellulaire (Matsumoto, Hayashi et al. 2012).

La phosphoprotéine P :

La phosphoprotéine a un poids moléculaire de 24 kDa et interagit avec les protéines N, L et X (Figure 5).

C'est un cofacteur essentiel de la polymérase virale. En effet, l'oligomérisation de la P est essentielle à la formation des complexes de polymérase actifs. La P du

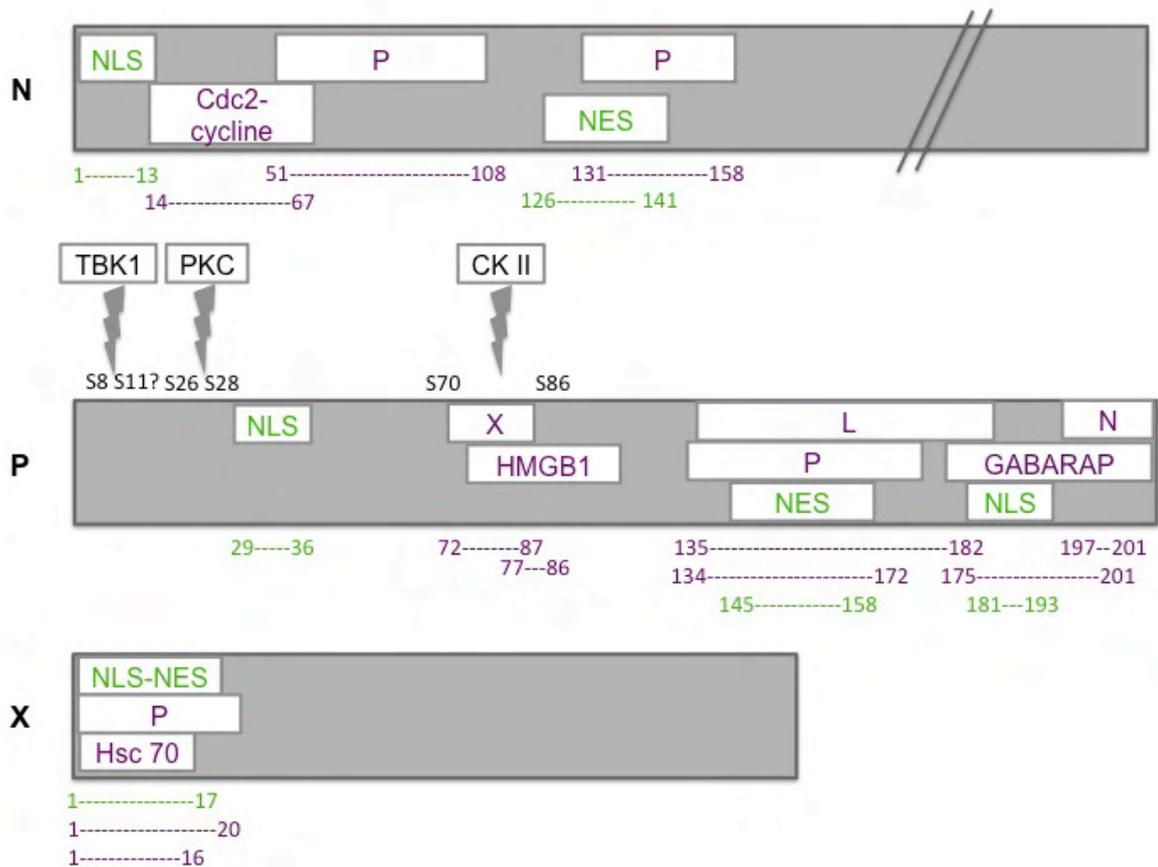


Figure 5 : Carte des motifs identifiés au sein des protéines N, P et X du BDV.

Les NLS (signal de localisation nucléaire) et NES (signal d'export nucléaire) de chaque protéine sont indiqués en vert. Les sites d'interaction avec les différentes protéines virales ou cellulaires : Cdc2-cycline, High-mobility group protein B1 (HMGB1), récepteur à l'acide gamma amino butyrique A (GABARAP), Heat Shock cognate protein 70 (Hsc70) sont indiqués en violet. La position respective de chaque interaction est indiquée en dessous de chaque protéine. Les sites de phosphorylation par les kinases cellulaires TANK Binding Kinase 1 (TBK1), protéine kinase C (PKC) et caséine kinase II (CKII) sont signalés par les flèches.

BDV possédant des domaines de liaison de la N et de L mutuellement exclusifs, une partie de ces oligomères se fixent à la N et une autre partie à la L. Sachant que la N n'interagit pas directement avec L, la protéine P serait le lien entre le complexe N-ARN viral et la L. En analogie avec le virus de Sendai, le complexe L-P du BDV pourrait se déplacer sur le complexe P-N-ARN par interaction consécutive d'une sous unité de P du complexe L-P avec une sous unité de P du complexe P-N-ARN (Schneider, Blechschmidt et al. 2004). Enfin, contrairement aux autres *Mononegavirales*, l'activité de cofacteur de la polymérase de la P est négativement régulée lorsqu'elle est phosphorylée (Schmid, Mayer et al. 2007).

La P présente plusieurs sites de phosphorylation par différentes kinases cellulaires, telles que la PKC ϵ , la caseine kinase II (Schwemmle, De et al. 1997) et TBK1 (TANK Binding Kinase) (Unterstab, Ludwig et al. 2005) (Figure 5). Il a été suggéré qu'elle pourrait se comporter comme un "substrat leurre" pour ces différentes kinases, empêchant ainsi la phosphorylation normale de leurs substrats endogènes dans la cellule infectée. Ceci pourrait avoir un rôle clé dans la perturbation du fonctionnement des cellules infectées, en particulier des perturbations de la plasticité synaptique ou des défauts de mise en place de la réponse antivirale.

Enfin, la P, grâce à son interaction avec HMGB1 (High-Mobility Group Protein B1, un composant non histone de la chromatine, impliqué dans l'architecture de celle-ci), permet de stabiliser l'interaction des vSPOT avec la chromatine (Matsumoto, Hayashi et al. 2012).

La protéine X :

La protéine X a un poids moléculaire de 10 kDa. Sa présence dans la particule virale n'a pas encore été déterminée.

La X, grâce à sa capacité à interagir avec la P, intervient dans la régulation de l'activité de la polymérase. La première hypothèse serait que la X séquestrerait la P dans le cytoplasme, limitant ainsi la quantité d'oligomères de P disponibles pour la synthèse de l'ARN viral dans le noyau (Kobayashi, Zhang et al. 2003). Récemment cette hypothèse a été revue. La X en interagissant avec la P, empêcherait la formation d'un complexe polymérase fonctionnel en bloquant l'association des complexes P-L et P-N-ARN ou en bloquant leur déplacement. La X serait donc un

modulateur négatif de l'activité de la polymérase du BDV (Poenisch, Unterstab et al. 2004; Schneider, Blechschmidt et al. 2004).

Cette protéine a un rôle anti-apoptotique. Les résultats montrent clairement que la X se localise majoritairement au niveau des mitochondries, et que, exprimée seule, elle protège les cellules d'une apoptose dépendante et indépendante des récepteurs pro-apoptotiques Fas. En bloquant la localisation mitochondriale de la X, il y a suppression de cet effet anti-apoptotique, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Poenisch, Burger et al. 2009).

La protéine de matrice M :

La protéine de matrice a un poids moléculaire de 16 kDa. Contrairement à ce qui avait été postulé au départ, elle n'est pas glycosylée.

En recrutant les constituants viraux, elle joue un rôle primordial dans le bourgeonnement des particules virales (Kraus, Bogner et al. 2005; Perez and de la Torre 2005)

De plus, il a été démontré que les tétramères de M étaient capables de se lier à l'ARN. La protéine M étant présente au cours de l'infection dans le cytoplasme et dans le noyau, elle joue vraisemblablement un rôle dans la formation des RNP (Neumann, Lieber et al. 2009).

La glycoprotéine G :

La glycoprotéine virale existe sous deux formes : gp84 et gp43.

La gp84 est N-glycosylée dans le réticulum endoplasmique (RE) et s'accumule au sein de celui-ci. Elle permet la reconnaissance du récepteur à la surface de la cellule hôte.

La forme gp43, quant à elle, est générée suite à une étape de digestion par une endoprotéase cellulaire dépendante du calcium, la furine (Gonzalez-Dunia, Cubitt et al. 1997) et correspond à la partie C-terminale de la gp84. Gp43 est localisée au niveau de la membrane cellulaire et joue un rôle dans la fusion membranaire dépendante de la baisse du pH (Perez, Watanabe et al. 2001).

La polymérase L :

La polymérase virale est une ARN polymérase ARN dépendante, d'un poids moléculaire de 190 kDa. Elle permet la réplication et la transcription de l'ARN génomique viral.

Toutes les interactions connues entre les protéines du BDV et les protéines cellulaires ont été répertoriées dans la Figure 5.

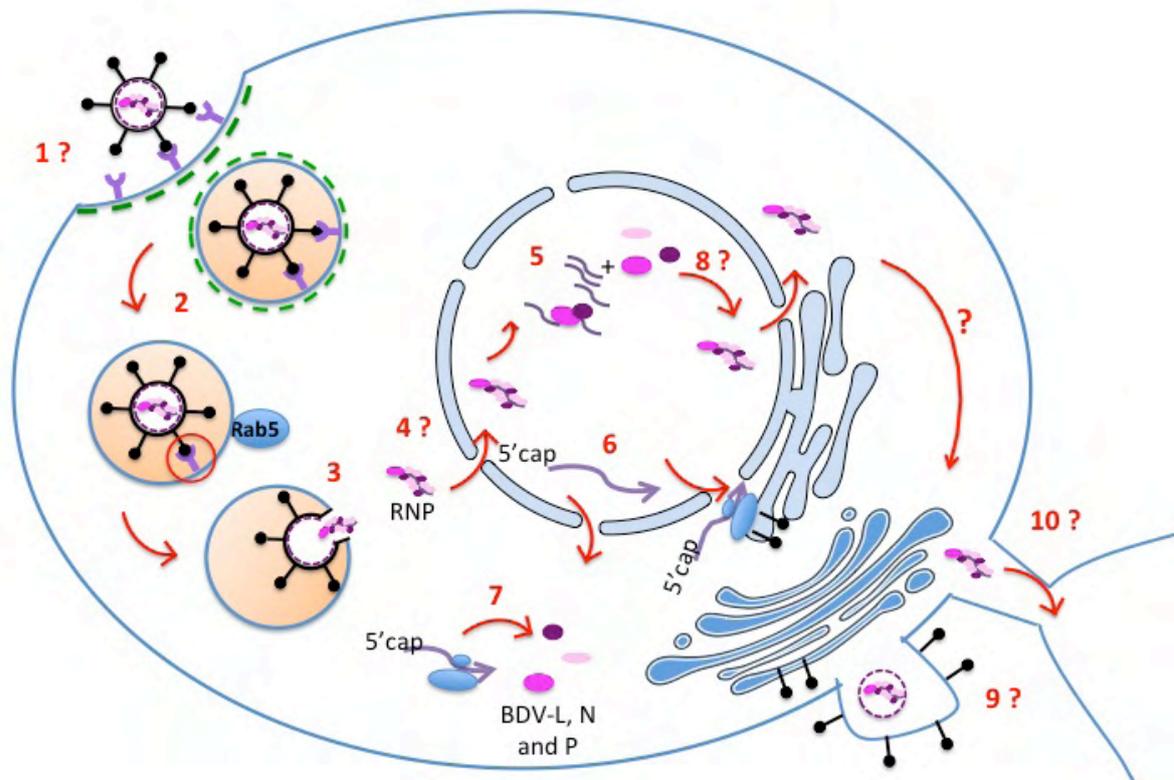


Figure 6 : Cycle viral

- 1- Reconnaissance d'un récepteur encore inconnu.
 - 2- Entrée par endocytose dépendante de la clathrine (en vert), maturation de la vésicule d'endocytose grâce à l'expression de Rab5.
 - 3- Acidification du pH à l'intérieur de l'endosome et libération de la RNP dans le cytoplasme.
 - 4- Adressage de la RNP dans le noyau.
 - 5- Réplication du génome viral.
 - 6- Transcription de l'ARN viral.
 - 7- Synthèse des protéines virales dans le cytoplasme. La maturation de la glycoprotéine a lieu dans le réticulum endoplasmique.
 - 8- Assemblage des nouvelles RNP puis adressage au niveau du site de réplication.
 - 9- Assemblage des nouvelles particules virales.
 - 10- Infection de la cellule voisine.
- Les étapes 1, 4, 8, 9 et 10 ne sont pas du tout caractérisées.

D- Cycle viral

1- Entrée du virus et adressage au noyau

La glycoprotéine gp84 du BDV, grâce à la reconnaissance d'un récepteur qui est à ce jour inconnu, permet l'entrée du BDV dans la cellule hôte (Gonzalez-Dunia, Cubitt et al. 1998) par endocytose dépendante de la clathrine (Figure 6 : étape 1) (Clemente and de la Torre 2009). La vésicule ainsi formée se détache de la membrane plasmique grâce à la dynamine. Une fois qu'elle est à l'intérieur de la cellule, elle perd rapidement sa couverture de clathrine et fusionne avec un endosome précoce (Figure 6 : étape 2). Ces étapes nécessitent la présence d'une petite GTPase appelée Rab5. Celle-ci joue aussi un rôle dans le transport des endosomes précoces vers le noyau. En effet, grâce à sa capacité à interagir avec les microtubules, Rab5 permet de réguler l'association des endosomes précoces avec les microtubules (MT) ainsi que leur mobilité vers l'extrémité moins des MT (Nielsen, Severin et al. 1999; Clemente and de la Torre 2009) (cf chapitre sur le transport). Ce transport nécessiterait aussi la présence de la chaîne légère de la dynéine 2B (DNCL2B, Dynein light chain 2B), puisque lorsque les cellules OL (dérivées d'un oligodendrogliome humain) sont traitées avec un siRNA ciblant DNCL2B, l'entrée du BDV est inhibée (Clemente, Sisman et al. 2010).

Une fois que l'endosome est à proximité du noyau, le pH à l'intérieur de celui-ci s'acidifie (Gonzalez-Dunia, Cubitt et al. 1998; Clemente and de la Torre 2009). La gp43 change alors de conformation et devient fusogène ce qui va permettre la fusion des membranes endosomales et virales et aboutir à la libération de la RNP dans le cytoplasme (Figure 6 : étape 3).

Les mécanismes qui permettent le transport de ces RNP et leur adressage jusqu'au noyau ne sont pas encore connus (Figure 6 : étape 4). La taille de la RNP étant incompatible avec un passage passif à travers les pores nucléaires (taille supérieure à 44 kDa), il doit exister un autre mécanisme de transport. Deux mécanismes d'import nucléaire pourraient permettre l'entrée des RNP dans le noyau. Le premier utiliserait les séquences de localisation nucléaire présentes dans les protéines qui composent la RNP. Les RNP utiliseraient la machinerie d'import

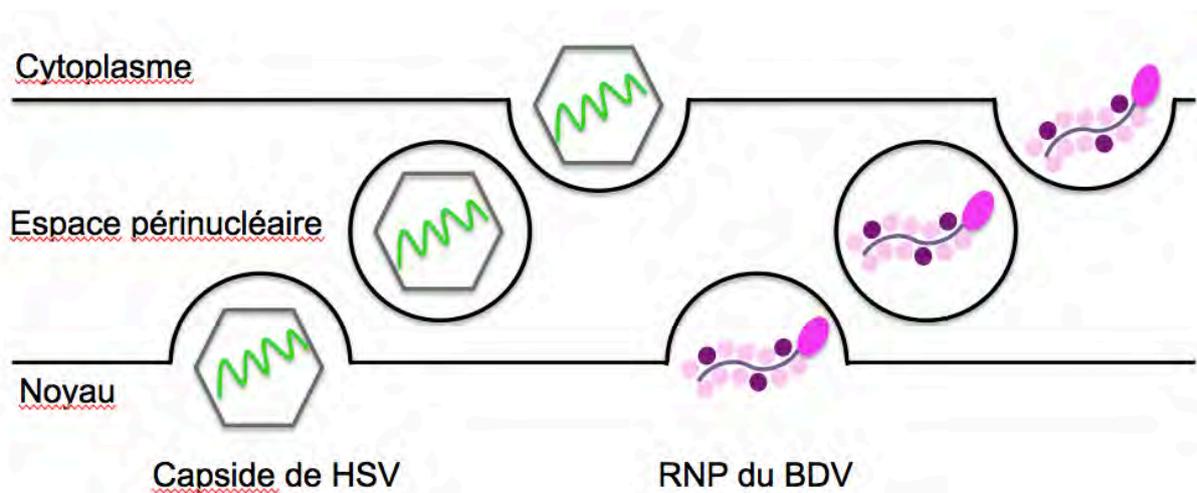


Figure 7 : Hypothèse sur le mécanisme de passage de la membrane nucléaire par la RNP du BDV

Tout comme la capside de HSV, la RNP du BDV pourrait se fixer à la membrane externe du noyau puis passerait dans l'espace inter-membranaire pour finalement être relarguée à l'intérieur du noyau.

classique dépendante de la présence d'ATP (Adénosine TriPhosphate) et des importines cellulaires. Le facteur limitant de ce mécanisme est la taille des molécules qui peuvent passer le pore nucléaire qui ne doit pas être supérieure à 40 nm. Or, la taille des RNP n'est pas précisément déterminée mais nous pensons qu'elle serait aux alentours de 60nm.

La seconde possibilité est que la RNP entre dans le noyau grâce à une désorganisation locale des lamines, les protéines responsables du maintien de la structure nucléaire (Figure 7). La RNP se fixerait à la membrane externe du noyau puis passerait dans l'espace inter-membranaire pour finalement être relarguée à l'intérieur du noyau. Ce type de passage est notamment utilisé par le virus Herpes Simplex (HSV) (Rose and Schlieker 2012).

2- Réplication et transcription virale

Une fois importées dans le noyau, grâce à la capacité des protéines N et P à interagir avec des composants de la chromatine, les RNP se rassemblent pour former des usines de réplication et de transcription virale appelées vSPOT (cf le chapitre Structure et Protéines virales).

La transcription :

Bien que moins prononcé pour le BDV que pour les autres *Mononegavirales*, il existe un gradient de transcription décroissant de 3' en 5' (Schneider 2005). Ce gradient de transcription résulte du fait que la transcription débute toujours en 3' du génome à partir d'un promoteur unique. Lorsque la polymérase virale atteint le signal de terminaison, elle finit la transcription de la première unité qui est polyadénylée. Ensuite, la polymérase virale peut rester fixée au génome et continuer la transcription en débutant au signal d'initiation suivant ou elle peut se décrocher directement du génome. Si elle se décroche, elle doit obligatoirement recommencer la transcription avec la première unité en 3' du génome. Ainsi, plus l'unité de transcription est éloignée de l'extrémité 3' du génome, plus la polymérase a de chances de se décrocher. Il en résulte que les transcrits situés le plus en 3' du génome sont plus fréquents dans les cellules infectées et qu'un gradient décroissant est créé de 3' en 5'.

Une fois les transcrits synthétisés, ils seront épissés, coiffés et polyadénylés comme les autres ARNm cellulaires (Figure 6 : étape 6).

La réplication :

Dans un second temps, la polymérase néosynthétisée réplique l'ARN génomique viral, de façon continue en un ARN « antigénomique » complet de polarité positive, l'initiation se faisant au niveau de l'extrémité 3'. En effet, en présence de N et de P, cette enzyme forme un complexe de réplication qui, contrairement à celui de la première vague de transcription, ignore les sites de terminaison de la transcription situés au niveau des régions intergéniques. Enfin, l'ARN positif néosynthétisé sert de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes viraux de polarité négative, destinés à être encapsidés (Figure 6 : étape 5).

3- Assemblage, relargage et dissémination

Les étapes ultérieures à la réplication et à la transcription virale sont très peu caractérisées (Figure 6 : étapes 8,9,10).

Nous pouvons supposer qu'une fois que les protéines virales de la RNP sont synthétisées, elles retournent dans le noyau grâce à leurs séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) pour former, avec les ARN génomiques viraux néo-synthétisés, les nouvelles RNP. Les RNP sortent ensuite du noyau et sont transportées jusqu'au site d'assemblage des nouveaux virions par des mécanismes totalement inconnus.

Des interrogations subsistent en ce qui concerne ce site d'assemblage. En effet, des études menées par l'équipe de Tomonaga (non publiées à ce jour) montrent par microscopie électronique, une accumulation de la glycoprotéine au niveau des membranes internes et externes du noyau. De plus, ils ont détecté la présence de lamine dans des purifications de virus. Ces résultats seraient en faveur d'un site d'assemblage au niveau du noyau. Des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

Enfin, le mécanisme qui permet le passage du BDV d'une cellule à l'autre est inconnu. En effet, l'infection par le BDV s'accompagne de la synthèse de très peu de particules virales libres, pourtant sa dissémination au sein d'une culture de neurones est extrêmement rapide. Nous pensons donc que l'infection des cellules voisines ne

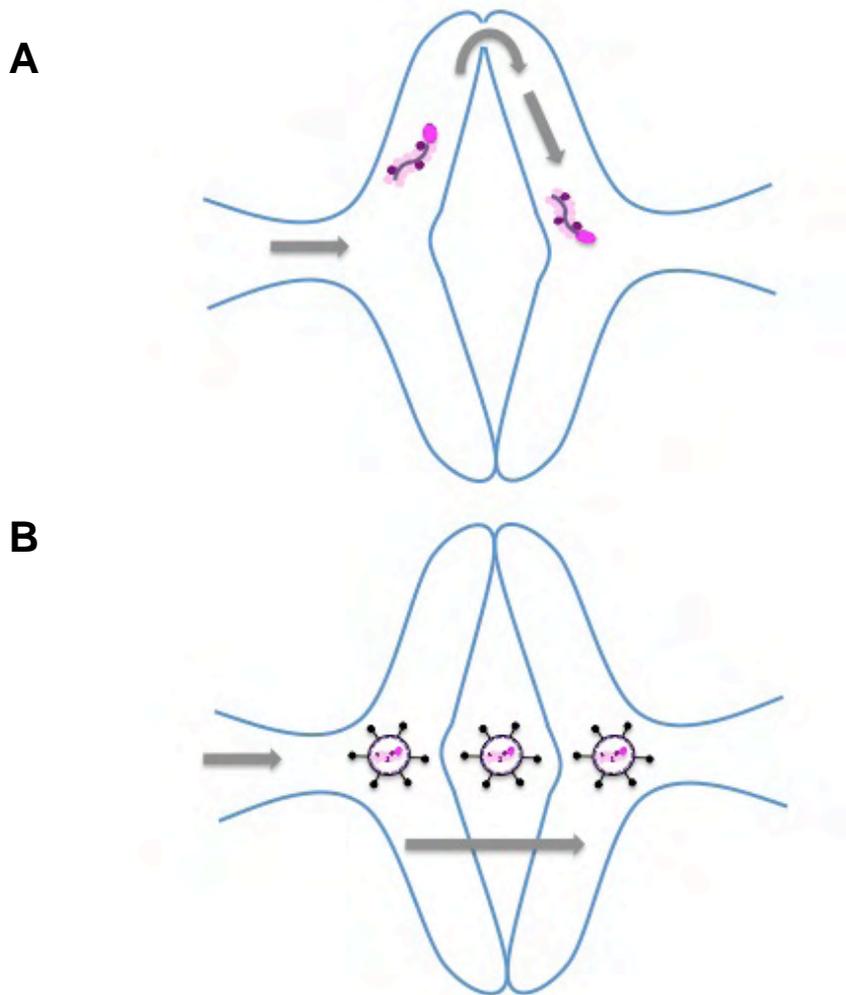


Figure 8 : Hypothèses sur le mécanisme de passage du BDV d'un neurone à l'autre.

A- Phénomène de microfusion entre les deux membranes synaptiques

B- Passage transynaptique avec libération du matériel viral dans la lumière synaptique puis internalisation au niveau post-synaptique

se ferait pas via une particule virale enveloppée mais plutôt par l'intermédiaire de la RNP (Figure 8). Plusieurs mécanismes seraient alors possibles :

- des phénomènes de microfusion entre les membranes plasmiques de deux cellules proches ;
- le passage transynaptique avec libération du matériel viral dans la lumière synaptique puis internalisation au niveau post-synaptique.

Ces mécanismes nécessiteraient la présence de la glycoprotéine, puisque lorsqu'elle est bloquée avec des anticorps anti-G neutralisant, la dissémination du BDV dans les neurones est interrompue (Bajramovic, Münter et al. 2003). Cependant d'autres études ont montré que la G n'était pas toujours nécessaire pour l'infection d'une cellule voisine (Clemente and de la Torre 2007). En effet, Clemente et de la Torre émettent l'hypothèse selon laquelle le BDV infecterait en premier lieu une population spécifique de neurones du SNC, par un mécanisme dépendant d'un récepteur. Puis, sa propagation au reste du cerveau se ferait par dissémination virale de cellule à cellule ne nécessitant plus la présence de ce récepteur à la surface des cellules cibles.

La majorité des études portant sur le cycle viral ont été menées dans des lignées cellulaires non neuronales. Il est donc possible que les cycles viraux présentent des différences en fonction du type cellulaire étudié. En particulier, beaucoup d'inconnues subsistent en ce qui concerne le cycle viral dans les neurones, notamment, les modalités du transport axonal, qui est indispensable à la réplication et à la dissémination virale. Ces étapes de transport doivent nécessiter la présence de mécanismes spécialisés et performants car le BDV peut avoir de grandes distances à parcourir entre son site d'entrée et le noyau, ou entre le noyau et le site de sortie des particules virales.

II - LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE

Le cytosquelette est responsable de la morphologie de la cellule ainsi que de son organisation interne. Il lui permet ainsi de pouvoir se déplacer, se diviser mais aussi d'organiser ses organites à l'intérieur du cytoplasme. Enfin, il actionne et guide le transport intracellulaire des différents organites et protéines d'un bout à l'autre de la cellule.

Les deux composants majeurs du cytosquelette impliqués dans le transport intracellulaire sont les filaments d'actine et les MT. Le transport sur ces structures est médié par des moteurs, dont la myosine, qui se fixe sur les filaments d'actine et les dynéines et kinésines, qui se fixent sur les MT. En l'absence de ces transporteurs spécialisés, les molécules mettraient plusieurs jours, voire même plusieurs années pour atteindre leur destination.

A- Le cytosquelette et ses moteurs

1- Les filaments d'actine

a -Rôles et structure

Les filaments d'actine participent à une multitude de fonctions dans la cellule, incluant l'adhésion et la mobilité cellulaire, l'endocytose et l'exocytose (Hammer and Sellers 2012). Ils participent aussi à la localisation intracellulaire des organites et au transport vésiculaire.

En comparaison avec les MT, les filaments d'actine sont plus courts et le transport utilisant ces filaments est généralement plus lent (0.1 $\mu\text{m/s}$) (Apodaca 2001). Le transport des molécules est donc médié, en général, par le cytosquelette d'actine pour les distances courtes et par les MT pour les distances plus longues. Les filaments d'actine permettraient donc un transport au niveau local.

Par exemple, lors de l'endocytose du virus de la grippe, qui a besoin de rejoindre le noyau pour se répliquer, la formation et le transport précoce des vésicules d'endocytose sont effectués par le cytosquelette d'actine.

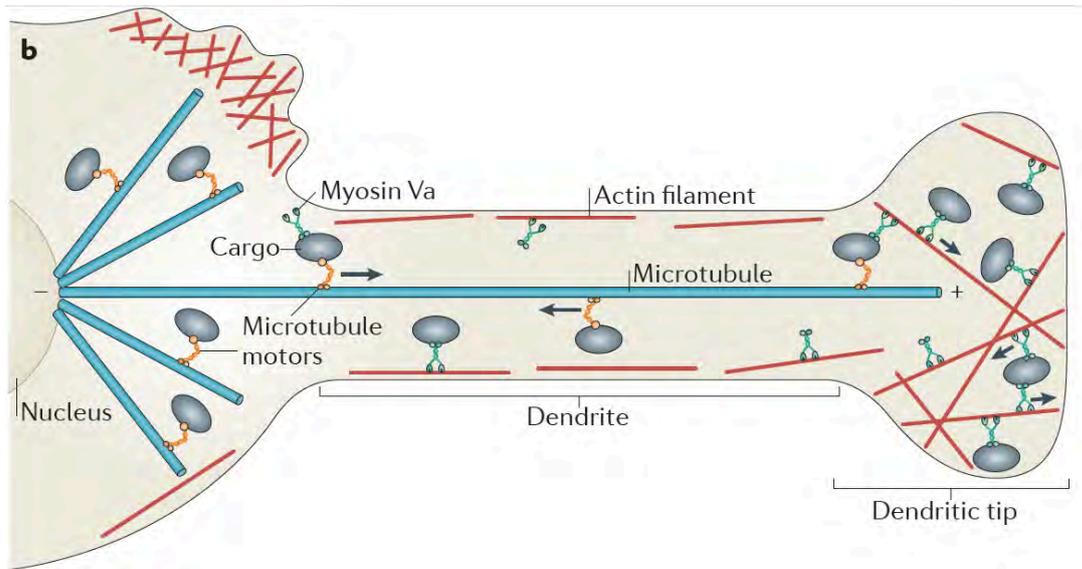


Figure 9 : Organisation du cytosquelette d'actine et des microtubules dans les neurones.

Schéma réalisé d'après Hammer et Sellers 2011.

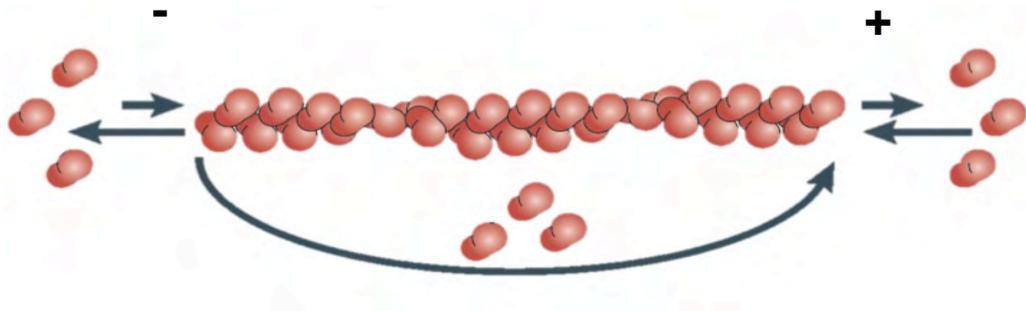


Figure 10 : Structure et dynamique des filaments d'actine.

Les flèches indiquent l'ajout ou l'élimination de l'actine glomérulaire au niveau des extrémités (+) et (-) des filaments d'actine. La grande flèche représente le recyclage de l'actine glomérulaire provenant de la dépolymérisation de l'extrémité (-) pour la polymérisation de l'extrémité (+).

Schéma issu de Lowery et Van Vactor, 2009

Puis, les vésicules sont prises en charge par les MT pour être dirigées vers le noyau de la cellule (Lakadamyali, Rust et al. 2003; Ross, Ali et al. 2008).

Dans les neurones, les filaments d'actine sont regroupés sous la membrane plasmique des axones et des dendrites. Ils sont aussi retrouvés en abondance au niveau des cônes de croissance, des épines dendritiques et des régions pré et post synaptiques (Figure 9) (Hirokawa, Niwa et al. 2010). L'enrichissement en actine dans ces différentes zones, pauvres en MT, permet le transport local des vésicules synaptiques (Bridgman 2004).

L'actine joue aussi un rôle dans le transport axonal (Bearer and Reese 1999; Bittins, Eichler et al. 2010). En effet, des études de microscopie électronique ont révélé une forte association entre les MT et les filaments d'actine au niveau des axones (Bearer and Reese 1999). Cette association est importante à la fois pour le maintien de l'intégrité de la structure de l'axone, mais aussi pour le transport axonal rapide. Des études ont permis de montrer que l'actine filamenteuse et son moteur, la myosine Va, étaient importantes pour le transport rétrograde des endosomes axonaux (Lalli, Gschmeissner et al. 2003). Cependant, les mécanismes moléculaires régulant la coordination entre la myosine et le transport rétrograde supporté par les MT ne sont pas encore connus. La nature précise des relations entre les réseaux de MT et d'actine dans les axones reste donc encore mal comprise à l'heure actuelle.

Les filaments d'actine sont composés de deux protofilaments parallèles enroulés l'un autour de l'autre (Figure 10). Chaque protofilament est lui même composé de sous-unités d'actine, appelées actines glomérulaires, assemblées les unes aux autres de façon orientée. Les filaments d'actine sont donc polarisés, avec une extrémité (+) et une extrémité (-). Cette notion de polarité est importante pour que la myosine avance dans une seule direction et conditionne l'assemblage des filaments. En effet, la polymérisation des filaments d'actine se déroule essentiellement au niveau de l'extrémité (+), qui grandit 5 à 10 fois plus vite que l'extrémité (-). Dans certaines conditions, l'extrémité (-) aura tendance à se dépolymériser, libérant ainsi de l'actine glomérulaire qui favorisera la polymérisation de l'extrémité (+) (Wegner 1976). Ce phénomène, très dynamique, forme un « tapis roulant » et permet entre autres à la cellule de se déplacer. Ce mécanisme est aussi détourné par certaines bactéries ou virus, comme le virus de la vaccine qui se

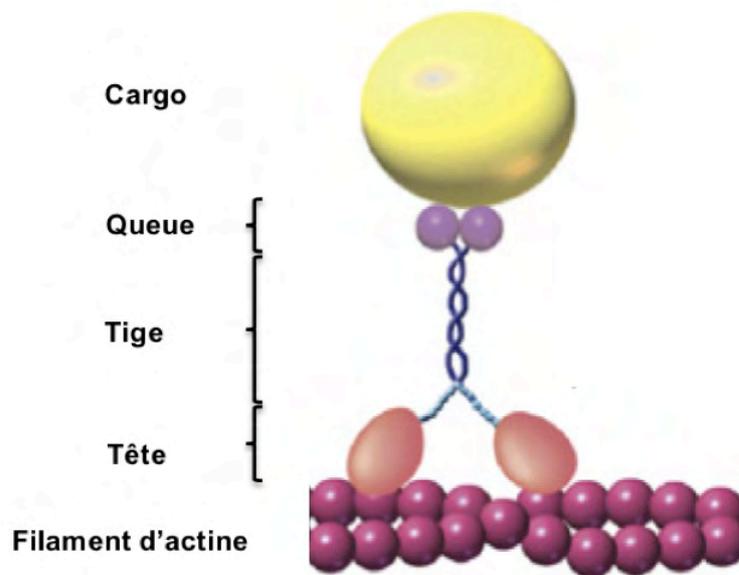


Figure 11 : Structure de la myosine.

La myosine est composée de trois domaines. La queue interagit avec le cargo représenté en jaune et la tête interagit avec les filaments d'actine représentés en roses.

Schéma issu d'Hirokawa, Niwa et al. 2010

déplace grâce à la formation de queues d'actine et utilise ces queues comme "tremplins" pour infecter les cellules avoisinantes (Cudmore, Cossart et al. 1995).

b -La myosine, moteur de l'actine

Le moteur moléculaire responsable du transport sur le cytosquelette d'actine est la myosine. Plusieurs classes de myosines existent, certaines permettent la contraction des muscles et d'autres sont plutôt impliquées dans le transport intracellulaire des organites et vésicules, appelés cargo.

La myosine est organisée en 3 domaines : la tête, la tige et la queue (Figure 11).

Les deux têtes globulaires sont chacune formées par la partie N terminale d'une des deux chaînes lourdes. La partie C-terminale, quant à elle, se fixe aux chaînes légères. Les têtes globulaires possèdent des sites de liaison à l'actine et à l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire pour que la myosine puisse avancer sur les filaments d'actine de façon orientée, de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) pour la majorité des myosines.

La tige est formée par les deux paires de chaînes légères enroulées en deux hélices. Cette région forme le « bras de levier » qui est flexible et nécessaire pour que la myosine puisse se mouvoir le long des filaments d'actine. Cette tige possède aussi un domaine organisé en faisceau d'hélices ("coiled-coil") qui permet aux myosines de s'oligomériser.

La queue, formée par les extrémités C-terminales des chaînes légères, permet la fixation des cargos ou d'autres myosines. Cette zone est spécifique d'un certain type de cargo et varie donc en fonction des classes de myosines.

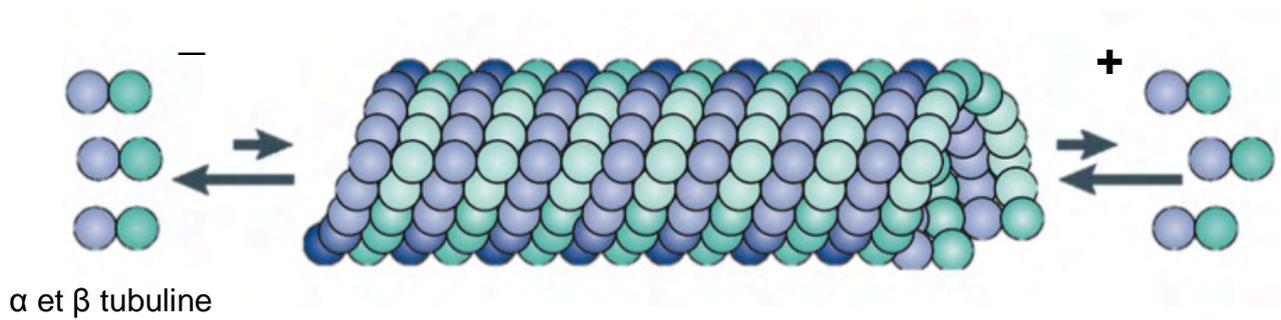


Figure 12 : Structure des microtubules.

Les flèches indiquent l'ajout ou l'élimination des tubulines α et β au niveau des extrémités (+) et (-) des filaments d'actine.

Schéma issu de Lowery et Van Vactor, 2009

2- Les microtubules

a- Rôles et structure

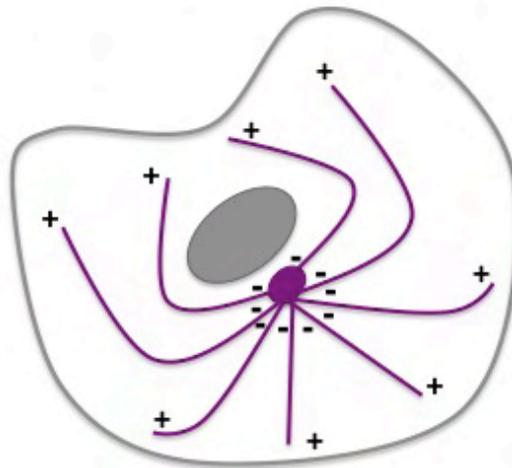
Les MT sont indispensables au transport intracellulaire des protéines et des organites et sont aussi impliqués dans les processus de mitose et de mobilité cellulaire. Ce sont de longs filaments qui permettent le transport rapide (1 μ m/s) de molécules sur de longues distances (Apodaca 2001). Ces propriétés en font le principal support du transport axonal (cf. partie sur le transport axonal).

Les MT ont une structure cylindrique creuse, construite à partir de 13 protofilaments parallèles, chacun composé d'une alternance de molécules de tubuline α et β (Figure 12). Comme les protofilaments sont orientés dans la même direction, les MT adoptent une polarité structurelle bien déterminée, avec les tubulines α au niveau de l'extrémité (-) et les tubulines β au niveau de l'extrémité (+). Tout comme pour les filaments d'actine, l'extrémité (+) est polymérisée plus vite que l'extrémité (-), un phénomène appelé instabilité dynamique (Mitchison and Kirschner 1984). Cette instabilité mène à une alternance de phases de croissance et de dépolymérisation et permet donc un remodelage rapide du cytosquelette, qui est nécessaire pour les processus de mitose, de migration cellulaire et de croissance axonale (Wehrle-Haller and Imhof 2003; Walczak and Heald 2008; Poulain and Sobel 2010). La polarité des MT est aussi nécessaire pour l'orientation du transport, qui peut avoir lieu dans les deux sens : de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) pour le transport rétrograde et de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) pour le transport antérograde.

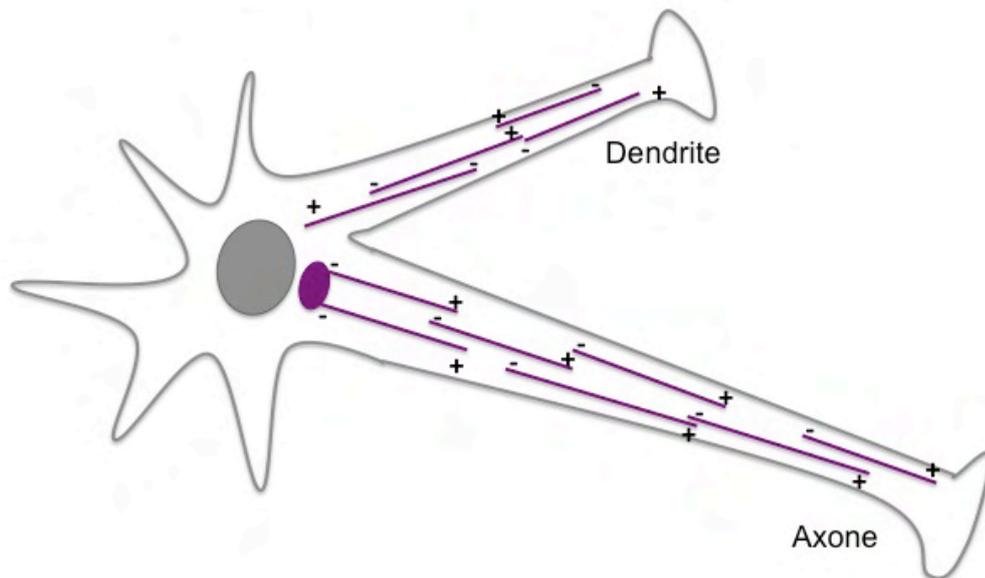
Dans une cellule classique, les MT rayonnent à partir du centre organisateur des microtubules ou centrosome, qui se situe à proximité du noyau, vers la périphérie de la cellule (Figure 13 A). Cette configuration forme une étoile, les extrémité (+), dynamiques, pointent vers la périphérie de la cellule et les extrémités (-), stables, sont regroupées près du noyau.

Dans les neurones, l'organisation des microtubules est plus complexe (Figure 13 B). Dans les axones, tous les microtubules sont orientés dans la même direction, leur extrémité (-) pointent vers les corps cellulaires, alors que leur extrémité

A



B



— Microtubules

● Centre organisateur des microtubules

Figure 13 : Organisation des microtubules dans une cellule classique (A) et dans une cellule neuronale (B).

(+) pointent vers les terminaisons axonales. Les MT ne font pas toute la longueur d'un axone, mais des courts segments de MT parallèles se chevauchent et constituent des rails pour le transport axonal rapide. Dans les dendrites, les microtubules ont une polarité mixte avec certaines extrémités (+) pointant vers l'intérieur et d'autres pointant vers l'extérieur.

b- Les moteurs des microtubules : les kinésines et les dynéines

Les kinésines :

Les kinésines sont les moteurs moléculaires permettant en général le transport antérograde de leur cargo, de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) des MT. Les kinésines sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le trafic vésiculaire, le positionnement du RE, le transport des ARNm, la régulation de voies de signalisation et les mouvements des chromosomes (Schliwa and Woehlke 2003).

Les kinésines font partie d'une superfamille protéique, dans laquelle le domaine moteur est le seul élément commun. De façon générale, la structure des kinésines est similaire à celles des myosines. Elle s'organise en trois parties : un domaine moteur formé par les deux chaînes lourdes, une tige souple formée par deux chaînes légères et un site de fixation pour le cargo formé par l'extrémité C-terminale des chaînes légères (Figure 14 A).

Les dynéines :

Les dynéines sont responsables du transport rétrograde des cargos et se déplacent donc vers l'extrémité (-) des MT. Elles sont classées en deux grands groupes : les dynéines cytoplasmiques, responsables du transport des vésicules, et les dynéines axonèmes, impliquées dans le battement des cils et des flagelles. Le groupe de dynéines qui nous intéressera pour notre étude est celui des dynéines cytoplasmiques. Elles sont associées notamment au transport des endosomes, des

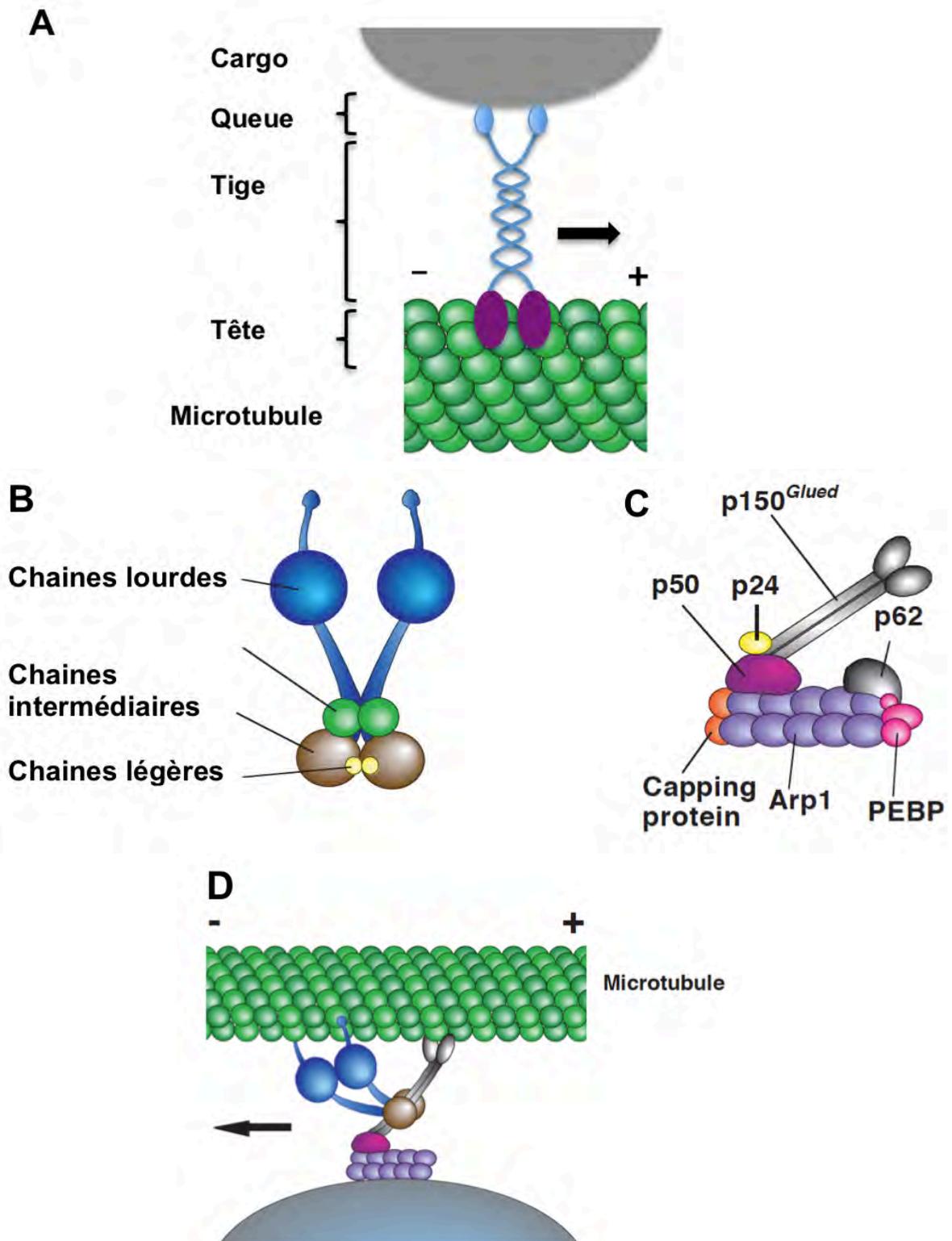


Figure 14 : Structure des kinésines, dynéines et dynactines.

A- Kinésines

B- Dynéines

C- Dynactines

D- Assemblage dynéines et dynactine

Schéma d'après Yamamoto et Hiraoka 2003

ARNm, à la régulation de la dégradation des protéines ou à la transduction du signal en transportant des protéines de signalisation.

Les dynéines cytoplasmiques sont constituées de deux chaînes lourdes, de six chaînes intermédiaires et de plusieurs chaînes légères (Figure 14 B). Tout comme pour les myosines et les kinésines, les chaînes lourdes sont responsables du déplacement des dynéines sur les MT et les chaînes intermédiaires et légères permettent la fixation du cargo.

Les dynéines sont souvent associées à un complexe protéique appelé dynactine (Figure 14 D). Ce complexe inclut des protéines comme p150^{Glued}, p62, dynamitine (aussi appelée p50), Arp 1 (Actin-Related Protein), CAPZa and CAPZb (Capping Actin Protein), p27, and p24 (Figure 14 C). La sous unité p150^{Glued} participe à la fixation du moteur aux MT et améliore sa processivité (Karki and Holzbaur 1995; Vaughan and Vallee 1995; King and Schroer 2000). La dynamitine, qui est impliquée dans les interactions entre protéines, joue un rôle important dans la structure de la dynactine (Echeverri, Paschal et al. 1996). Sa surexpression entraîne la déstructuration de la dynactine (Burkhardt, Echeverri et al. 1997; Valetti, Wetzal et al. 1999).

La dynactine permet de réguler l'activité de la dynéine et sa fixation au cargo en favorisant son recrutement au niveau des vésicules et des ribonucléoparticules (Schroer 2004). Il a notamment été montré que la dynactine permettait d'augmenter la distance parcourue par la dynéine, en diminuant les fréquences de dissociation des dynéines avec les MT, (King and Schroer 2000). La dynactine affecte aussi l'activité ATPase de la dynéine en modulant son état de phosphorylation (Kumar, Lee et al. 2000).

Le complexe dynéine-dynactine joue un rôle très important non seulement dans le transport axonal (Puls, Jonnakuty et al. 2003) mais aussi dans le transport des endosomes et des vésicules associées à l'appareil de Golgi (Presley, Cole et al. 1997; Valetti, Wetzal et al. 1999). Ce complexe est détourné par de nombreux virus pour leur transport, comme pour le virus herpes simplex : HSV-1 (Dohner, Wolfstein et al. 2002) ou les adénovirus (Suomalainen, Nakano et al. 1999). Enfin, la dynactine pourrait également jouer un rôle dans le transport antérograde médié par les kinésines. En effet, il a été montré que le transport rétrograde et antérograde de gros cargos comme les mélanosomes était inhibé lorsque le complexe dynéine-dynactine est déstabilisé par surexpression de la dynamitine (Deacon, Serpinskaya et al. 2003).

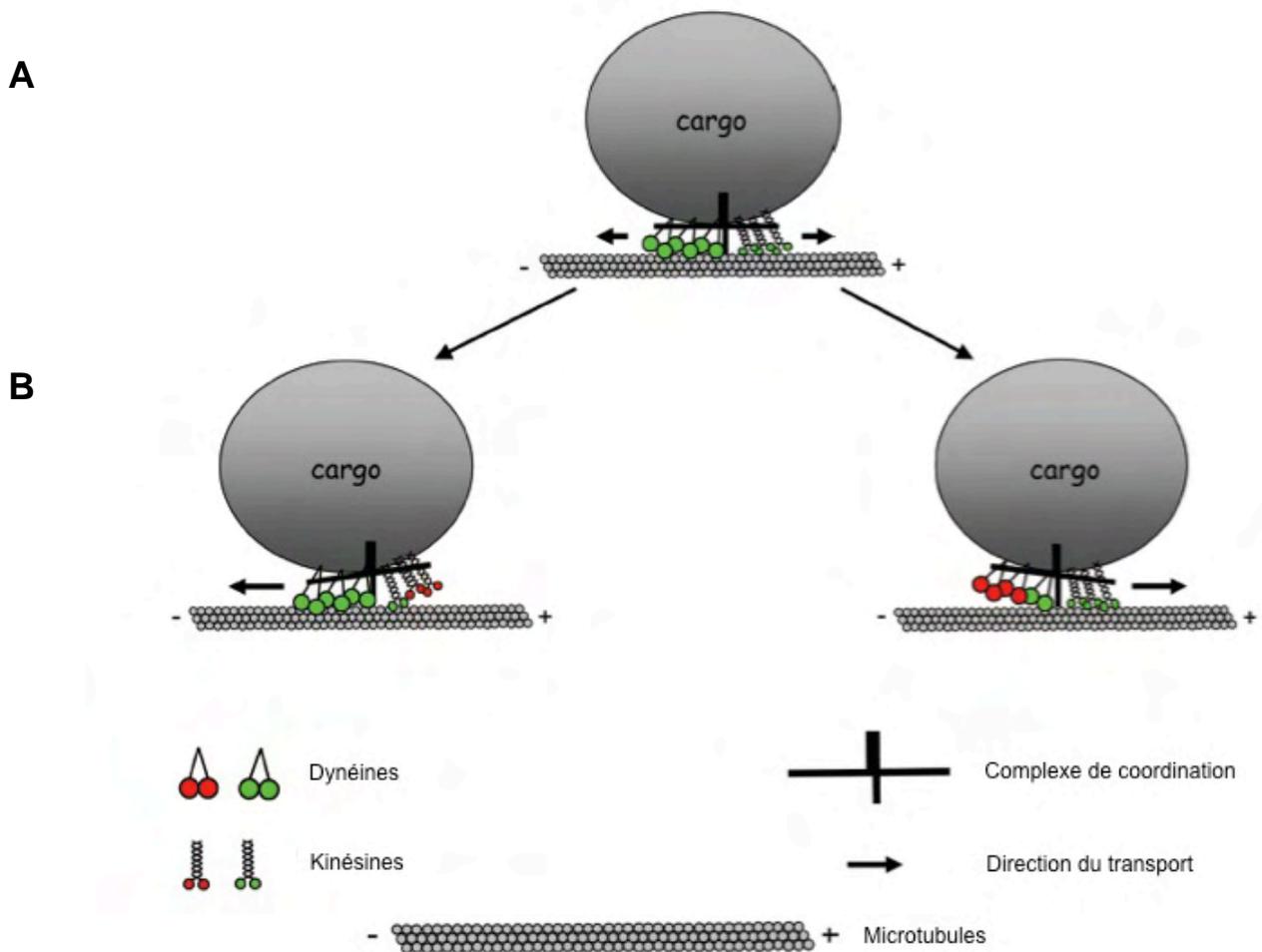


Figure 15 : Coordination des kinésines et dynéines

(A) Modèle « bras de fer ». Les dynéines et kinésines sont fixées sur le même cargo et vont dans des sens opposés. Le détachement aléatoire de l'une ou de l'autre permet un mouvement bidirectionnel sur de courtes distances.

(B) Modèle de coordination des deux moteurs. Cette coordination permet de déterminer le groupe de moteur « gagnant ». Le groupe « perdant » n'est pas totalement inhibé. Ceci permettrait d'augmenter la processivité du transport ou de surmonter les obstacles sur la voie de microtubules et donc de favoriser le mouvement des cargos sur de longues distances.

Schéma d'après Bryantseva et Zhapparova 2012

Rôle coordonné des kinésines et des dynéines :

Les dynéines et les kinésines, même si elles sont chacune spécialisées dans un type de transport, coopèrent cependant pour le transport intracellulaire de certains cargos, qui changent parfois régulièrement de direction avant d'atteindre leur destination finale. Ce changement de direction est rendu possible par la présence de moteurs de polarité opposée à la surface d'un même cargo. L'inhibition de l'un de ceux-ci entraîne une diminution drastique du transport dans les deux directions, suggérant l'existence d'un mécanisme de coordination des deux moteurs pour que le cargo puisse avancer. Cette dynamique a notamment été observée lors du transport de l'adénovirus canin CAV-2 (Salinas, Bilisland et al. 2009) ou des vésicules permettant le transport de la protéine Prion (Encalada, Szpankowski et al. 2011).

Plusieurs hypothèses pourraient permettre d'expliquer comment les deux moteurs sont coordonnés. Tout d'abord, il pourrait se produire une alternance de phases d'association et de dissociation des moteurs à la surface du cargo. Il est aussi possible que les deux moteurs soient présents en même temps à la surface du cargo et que leur activité soit coordonnée (si un seul type de moteur est actif à la fois). Enfin, si les deux moteurs sont actifs en même temps, ils pourraient générer chacun des forces opposées, ce modèle est appelé « tug-of-war » ou « bras de fer » (Gross 2004; Welte 2004). Certains auteurs émettent l'hypothèse que les théories de coordination et de « bras de fer » seraient complémentaires : le cargo interagirait avec deux groupes de moteurs actifs, la direction et le groupe « gagnant » seraient déterminés par la coordination des complexes, mais l'activité du complexe « perdant » ne serait pas inhibée et persisterait en activité de fond (Figure 15). Cette activité de fond pourrait améliorer l'efficacité globale du transport en augmentant la processivité du transport ou en aidant à surmonter les obstacles sur la voie des microtubules. Cependant, dans l'état actuel des connaissances, il est encore difficile de trancher entre les différentes hypothèses concernant le mécanisme à l'origine du transport bidirectionnel.

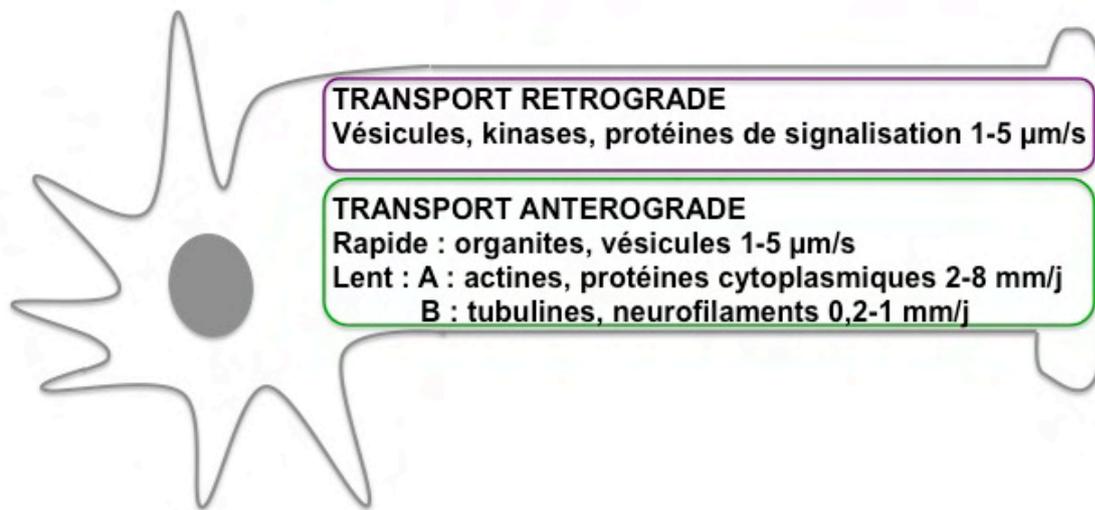


Figure 16 : Les différentes catégories de transport axonal

D'après Goldstein et Yang, 2000

B- Le transport axonal

1- Généralités

Les neurones sont des cellules extrêmement polarisées qui ont besoin d'une machinerie de transport efficace pour pouvoir recevoir, intégrer et transmettre des signaux indispensables pour leur différenciation, leur fonctionnement et leur survie. Les axones peuvent être très longs, dans le cas d'un motoneurone par exemple, ils peuvent mesurer jusqu'à un mètre de long. Comme nous l'avons vu précédemment, le principal support du transport axonal est le réseau de MT et ses moteurs, les kinésines et les dynéines. En l'absence d'une machinerie de transport spécialisée, les vésicules d'environ 100 nm de diamètre mettraient plus d'une centaine d'année pour parcourir 1 cm (Sodeik 2000). Il n'est donc pas surprenant que des mutations dans ces complexes moteurs ou dans les protéines associées soient à l'origine de troubles neurologiques sévères (Salinas, Bilsland et al. 2008). Par exemple, des mutations dans une des sous unités de la dynactine, p150^{Glued}, ont été associées à certains cas familiaux une sclérose latérale amyotrophique. Par ailleurs, des mutations sur une classe de kinésines, la KIF1B β , sont responsables de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 A.

Le transport axonal peut être classé en deux catégories : le transport axonal rapide et le transport axonal lent (Figure 16) (Goldstein and Yang 2000).

Le transport rapide est médié par les kinésines et les complexes dynéines-dynactines. La myosine pourrait aussi être impliquée dans ce processus, même si son rôle n'est pas encore clairement établi. Le transport rapide permet le transport des organites et des vésicules à une vitesse d'environ 1-5 $\mu\text{m/s}$. De façon surprenante, des résultats récents ont montré que la source principale d'énergie pour ce type de transport n'était pas fournie par les mitochondries, mais plutôt par la glycolyse (Zala, Hinckelmann et al. 2013). En effet, lorsque la production d'énergie par les mitochondries est inhibée, le transport des vésicules contenant des neurotrophines comme le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) n'est pas affecté. En revanche, lorsque la glycolyse est inhibée, le transport rétrograde et antérograde des vésicules est affecté de façon majeure, contrairement à celui des mitochondries qui reste inchangé. L'enzyme qui permet cette production d'énergie

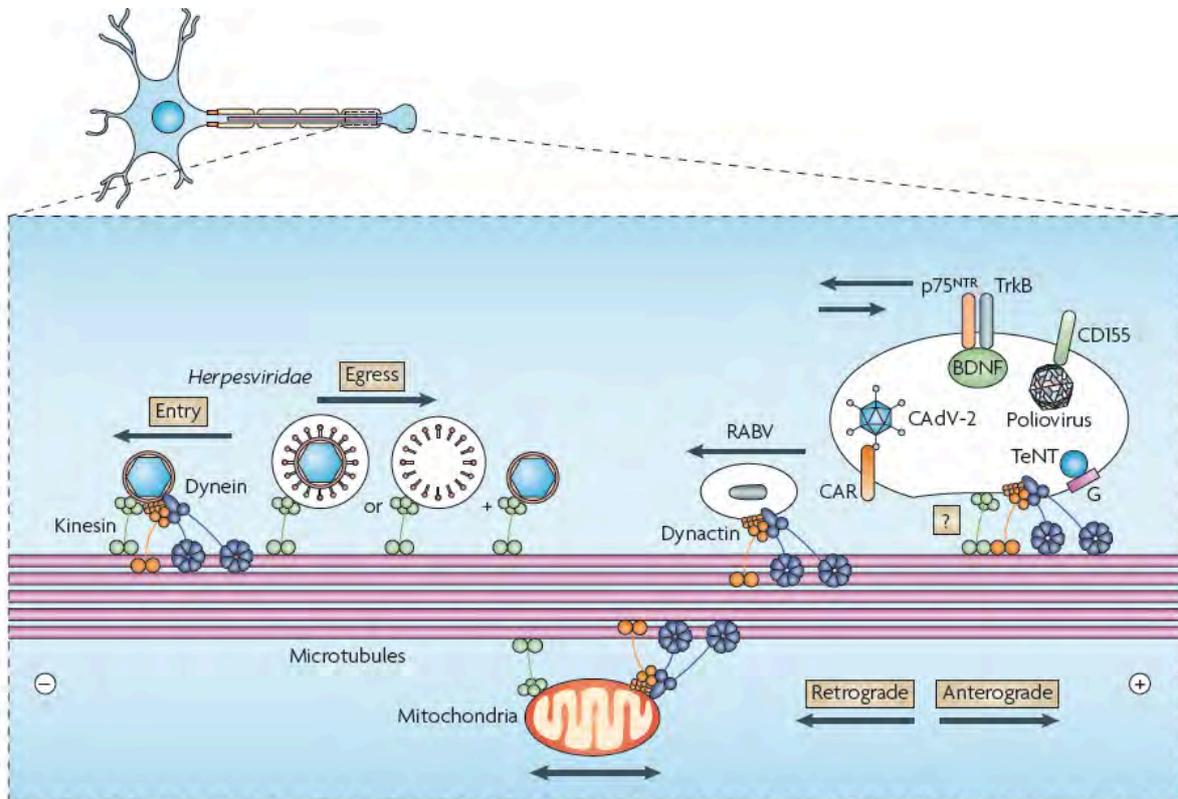


Figure 17 : Transport axonal des virus et toxines.

Les agents microbiens exploitent de nombreux mécanismes utilisés par les organites endogènes comme les mitochondries et les vésicules d'endocytose pour leur transport dans le système nerveux. Les protéines du tégument du virus herpes simplex se fixent directement à la dynéine pour le transport rétrograde. Pour son transport antérograde, soit le virus enveloppé est transporté dans une vésicule soit les protéines d'enveloppe sont transportées dans une vésicule alors que la capsid entourée des protéines de tégument est directement fixée à la kinésine. Le virus de la rage (RABV) est transporté sous sa forme enveloppée dans des vésicules. L'adénovirus canin (CA2V-2), le virus de la poliomyélite (Poliovirus) ou la toxine tétanique (TeNT), ainsi que leurs récepteurs, sont transportés comme le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) dans des endosomes axonaux.

Schéma de Salinas, Schiavo et al. 2010

est la GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate DéHydrogénase), qui est d'ailleurs retrouvée à la surface des vésicules axonales transportées de façon rapide.

Le transport lent, lui aussi médié par les kinésines et les dynéines, permet le transport de protéines solubles et peut être sous divisé en deux catégories. La catégorie A regroupe le transport des protéines qui composent les microtubules et les neurofilaments, qui sont transportées à une vitesse comprise entre 0,2 et 1 mm par jour. La catégorie B, quant à elle, comprend le transport des protéines du cytosquelette d'actine et des protéines cytoplasmiques, transportées à une vitesse de 2 à 8 mm/jour. Ce type de transport est nécessaire au maintien de l'homéostasie neuronale.

Certains pathogènes neurotropes infectent l'organisme au niveau des nerfs périphériques et détournent les effecteurs du transport axonal rapide pour remonter le long des axones et atteindre le soma. Pour les virus qui se répliquent dans le noyau, cette étape est une condition essentielle pour qu'ils puissent se multiplier. L'infection par voie nerveuse permet en outre de se dispenser d'un passage au travers de la barrière hématoencéphalique pour atteindre le système nerveux central.

Ces agents pathogènes neurotropes, parfois manipulés afin de leur permettre d'exprimer des protéines fluorescentes comme la GFP, sont des outils précieux pour étudier les modalités du transport dans les neurones. Ainsi, les modalités du transport axonal de certains pathogènes neurotropes tels que HSV, le virus de la poliomyélite, l'adénovirus canin CAV-2, la toxine tétanique (TeNT) ou le virus de la rage commencent à être bien caractérisées (Figure 17) (Salinas, Schiavo et al. 2010). Ces pathogènes utilisent chacun une stratégie spécifique leur permettant de détourner les effecteurs du transport axonal et peuvent être divisés en deux catégories : ceux dont les protéines se fixent directement aux moteurs et ceux qui sont transportés par l'intermédiaire d'une vésicule.

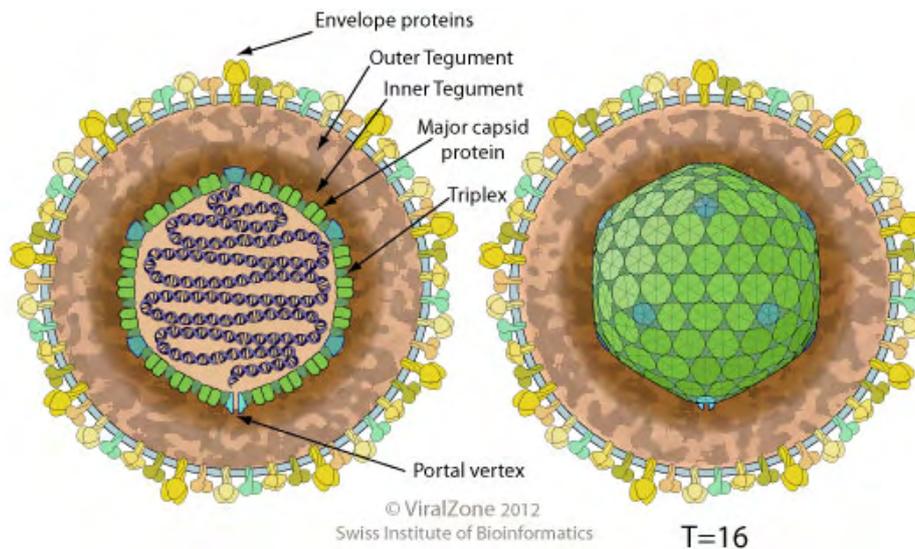


Figure 18 : Représentation schématique d'une particule virale du virus Herpes Simplex.

L'enveloppe virale est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées les différentes glycoprotéines virales (en jaune). A l'intérieur de la particule virale se trouvent les protéines du tégument (en marron) et le génome (en violet) entouré par une capsid (en vert).

Schéma issu de ViralZone

2- Transport des pathogènes par fixation directe au moteur

Le principal exemple de transport par fixation directe d'un virus à un moteur est le virus Herpes Simplex (HSV).

HSV fait partie de la famille des *Herpesviridae*. Il s'agit d'un virus enveloppé dont le génome est composé d'une molécule d'ADN double brin (Figure 18). Il pénètre généralement dans l'organisme au niveau des cellules de la peau ou des muqueuses, dans lesquelles il effectue un premier cycle de réplication. Il infecte ensuite les neurones sensoriels au niveau de leur terminaisons axonales avant de remonter jusqu'au corps cellulaire. Cette étape de transport rétrograde est primordiale, puisqu'elle lui permet d'atteindre le noyau dans lequel aura lieu la réplication et la transcription de son génome.

L'entrée du virus dans les neurones s'effectuant à la suite de la fusion des membranes plasmiques et virales, le virus « nu », composé des protéines du tégument et de la capsid, est directement libéré dans le cytoplasme. Il traverse ensuite une zone sous-membranaire riche en actine corticale. Cette étape est très mal caractérisée et impliquerait les filaments d'actine et la stimulation de protéines cellulaires par phosphorylation (Wittels and Spear 1991; Qie, Marcellino et al. 1999; Garner 2003).

Certaines des protéines du tégument sont ensuite capables de recruter directement la dynéine, la dynactine et des protéines adaptatrices, (Dohner, Wolfstein et al. 2002), permettant ainsi le transport rétrograde du virus le long des MT (Figure 17). Le fait que plusieurs protéines du tégument reconnaissent la dynéine est très avantageux pour le virus, puisqu'il peut toujours être transporté même en cas de mutations de l'une de ces protéines.

Le virus entre ensuite dans le noyau, où après les étapes de réplication et de transcription, il établit une phase de latence (Knipe and Cliffe 2008). Cette phase de latence, plus ou moins longue, lui permet de persister dans la cellule hôte sans la détruire et de ne pas être détecté par le système immunitaire.

En réponse à certains stimuli, on observe une réactivation du virus, qui se réplique et produit de nouvelles particules virales. Celles-ci sont transportées de façon antérograde jusqu'à l'extrémité axonale. Le virus pourra alors infecter les cellules des muqueuses ou de la peau et être transmis par contact, à de nouveaux

individus. Il a été proposé deux modèles rendant compte des modalités de ce transport axonal antérograde : le modèle « marié » et le modèle « séparé » (Figure 17). Dans le modèle « marié », le virus enveloppé (entier) est transporté dans une vésicule (Ch'ng and Enquist 2005; del Rio, Ch'ng et al. 2005; Negatsch, Granzow et al. 2010; Huang, Lazear et al. 2011). Dans le modèle séparé, les protéines d'enveloppe sont transportées dans une vésicule alors que la capsidie entourée des protéines de tégument est directement fixée à la kinésine (Penfold, Armati et al. 1994; Holland, Miranda-Saksena et al. 1999; Snyder, Wisner et al. 2006; Snyder, Bruun et al. 2007; Snyder, Polcicova et al. 2008). Le virus est ensuite assemblé au niveau de l'extrémité terminale de l'axone (Ibiricu, Huiskonen et al. 2011).

Dans la littérature, la majorité des études portant sur le transport axonal d'HSV ont été réalisées en faisant appel à des approches de microscopie électronique ou photonique, ce qui n'a pas permis de faire la part entre ces deux modèles. Plus récemment, de nouveaux modèles ont été développés, notamment un virus recombinant dont la glycoprotéine d'enveloppe et la protéine de capsidie sont marquées avec deux fluorochromes différents (Wisner, Sugimoto et al. 2011). Après infection de neurones avec ces virus recombinants, la visualisation du transport de HSV en temps réel a permis de conclure que le transport antérograde d'HSV pouvait se dérouler simultanément selon les deux modèles.

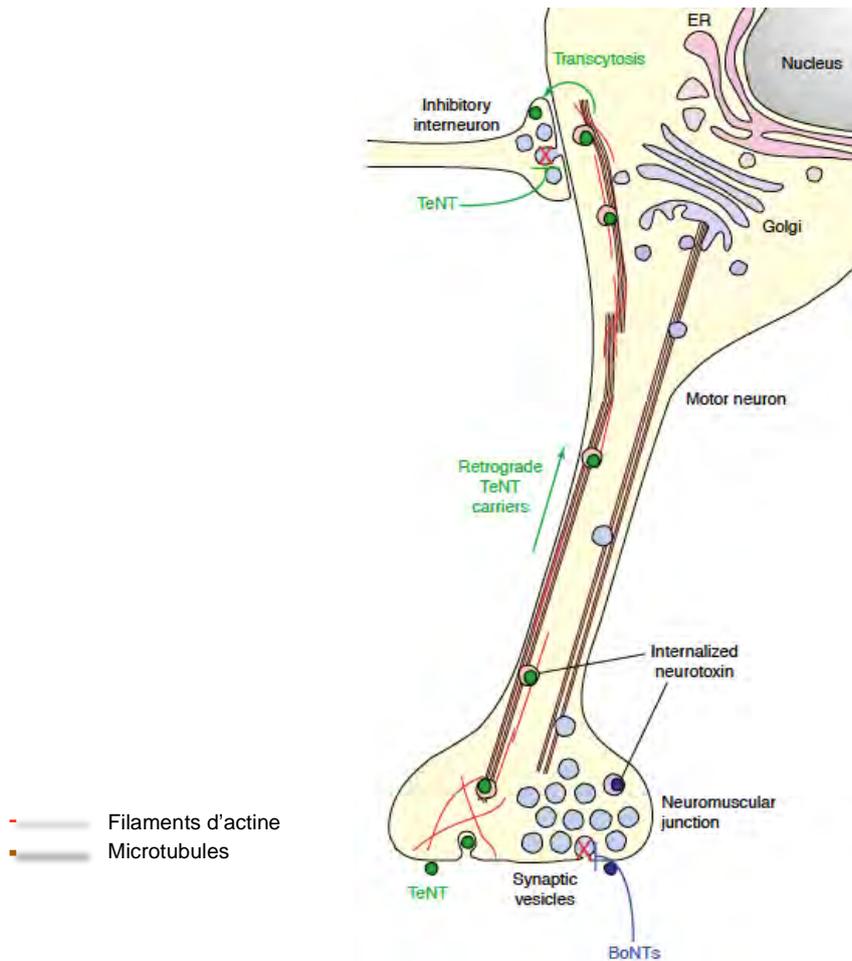


Figure 19 : Site d'action et transport de la TeNT.

Schéma de Lalli, Bonhert et al. 2003

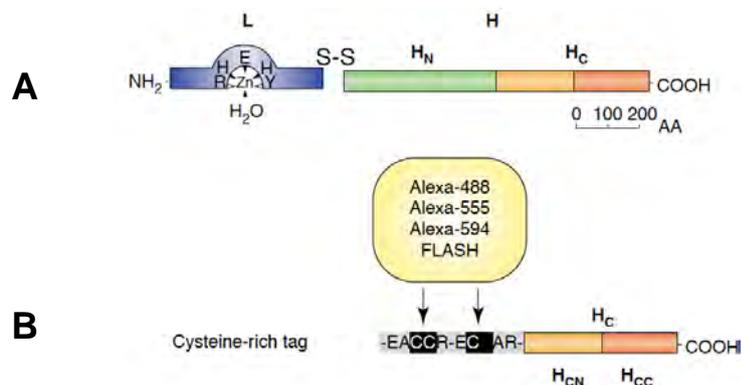


Figure 20 : Structure de la TeNT et du fragment Hc.

(A) La TeNT est composée d'une chaîne lourde (en vert, orange et rouge) et d'une chaîne légère (en bleu). La partie C-terminale de la chaîne lourde, appelée fragment Hc est représentée en orange et rouge.

(B) Construction d'un fragment Hc couplé à un motif tétracystéine permettant la fixation d'un fluorochrome (en jaune) ou d'une bille magnétique.

Schéma de Lalli, Bohnert et al. 2003

3- Transport du cargo par l'intermédiaire d'une vésicule

a- Transport dans les endosomes axonaux

Les endosomes axonaux sont des vésicules spécialisées responsables du transport de certaines neurotrophines et de leurs récepteurs, comme le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) et son récepteur TrkB, (Tyrosine Kinase B) ou le NGF (Nerve Growth Factor) et p75^{NTR}. Ce transport permet la transmission du signal depuis l'extrémité des axones jusqu'au corps cellulaire. Ces endosomes sont aussi utilisés pour le transport axonal de certains virus et toxines, comme l'adénovirus canin (CAV-2), le poliovirus et la toxine tétanique (TeNT) (Figure 17) (Salinas, Schiavo et al. 2010). Cette dernière s'est avérée être un outil précieux pour l'étude des caractéristiques de ces endosomes axonaux.

La TeNT est produite par la bactérie *Clostridium tetani*, l'agent causal du tétanos. Cette toxine entre dans le système nerveux au niveau des jonctions neuromusculaires, où elle est internalisée et transportée de façon rétrograde dans les axones des neurones moteurs. Une fois qu'elle a atteint le corps cellulaire, elle est transmise par transcytose à un interneurone inhibiteur adjacent dans lequel elle bloque le relargage des neurotransmetteurs, entraînant ainsi une paralysie (Figure 19) (Lalli, Bohnert et al. 2003).

La TeNT est composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère (Figure 20 A) (Lalli, Bohnert et al. 2003). La partie C-terminale de la chaîne lourde, appelée fragment Hc, permet la fixation, l'internalisation et le transport de la toxine, mais n'est pas toxique. La chaîne légère, est quant à elle la partie de la protéine responsable du clivage des protéines SNARE (Soluble NSF Attachment Protein REceptor) situées au niveau présynaptique, conduisant ainsi au blocage du relargage des neurotransmetteurs. Le fragment Hc étant suffisant pour l'internalisation et le transport de la TeNT, il a été construit une protéine recombinante dans laquelle ce fragment Hc a été fusionné à une étiquette riche en cystéines. Cette étiquette permet le couplage à divers fluorophores, voire à une bille magnétique, fournissant un outil précieux pour l'analyse de l'internalisation de la TeNT et de son transport dans les axones (Figure 20 B) (Deinhardt, Salinas et al. 2006).

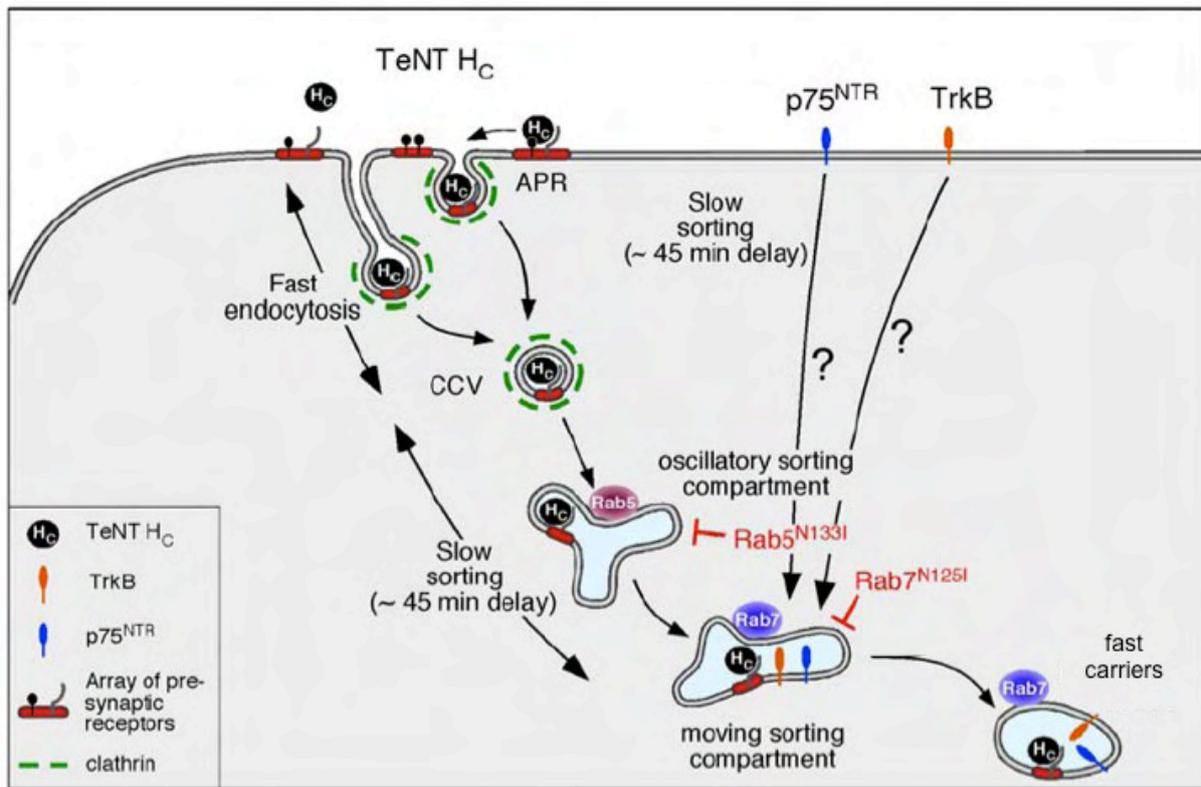


Figure 21 : Endocytose de la TeNT couplée au transport axonal rétrograde dans les neurones moteurs.

Après son internalisation via un phénomène d'endocytose dépendant de la clathrine, la TeNT utilise le transport axonal rétrograde rapide pour son transport jusqu'au soma. La première étape est la formation d'un endosome statique exprimant Rab5. Puis, Rab5 est remplacé par Rab7, l'endosome est alors en mouvement. Les protéines Rab5 et Rab7 sont essentielles pour le transport des endosomes axonaux, puisque lorsque l'une ou l'autre de ces protéines est inhibée par l'expression d'un dominant négatif, le transport rétrograde de la TeNT et des neurotrophines est bloqué. La voie de transport de la TeNT est partagée par les récepteurs aux neurotrophines p75^{NTR} et TrkB ainsi que leur ligand NGF et BDNF, bien qu'on ignore actuellement à quel stade ces voies convergent.

Schéma d'après Deinhardt, Salinas et al. 2006

De façon plus générale, l'utilisation du fragment Hc a permis de mieux caractériser les modalités du transport médié par les endosomes axonaux, applicable également au transport des neurotrophines (NGF et BDNF) (Figure 21) (Lalli and Schiavo 2002; Deinhardt, Salinas et al. 2006).

A la surface des neurones, la TeNT reconnaît Thy1, une glycoprotéine possédant une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), (Herreros, Ng et al. 2001). Cette protéine est l'un des récepteurs de la TeNT, qui permet son entrée dans les neurones par endocytose dépendante de la clathrine (Deinhardt, Berninghausen et al. 2006). La vésicule d'endocytose perd rapidement sa couverture de clathrine et fusionne avec un endosome précoce. Les protéines Rab5 et Rab7 sont requises pour les différentes étapes allant de la formation de la vésicule d'endocytose au transport des endosomes dans les axones (Delcroix, Valletta et al. 2003; Deinhardt, Salinas et al. 2006).

Les protéines Rab sont des petites GTPases (Guanosine Triphosphate), essentielles pour la régulation du transport intracellulaire (Zerial and McBride 2001) et pour la progression des cargos dans le système endosomal (Rink, Ghigo et al. 2005). En effet, elles permettent de réguler la formation des vésicules, leurs mouvements, et la fusion avec leur membrane cible. Rab5 va par exemple réguler les étapes de formation des vésicules d'endocytoses et de fusion avec un endosome précoce. Cet endosome, en fonction des protéines Rab qui seront exprimées à sa surface, pourra ensuite être adressé à différents compartiments cellulaires, comme la membrane plasmique pour être recyclé, ou vers les lysosomes pour que son contenu soit dégradé.

Dans le cas de la TeNT et des neurotrophines, les endosomes expriment séquentiellement Rab5 puis Rab7 à leur surface. Les endosomes associés à Rab5 ont des mouvements oscillatoires, contrairement aux endosomes associés à Rab7 qui progressent le long des axones. Rab5 et Rab7 sont essentielles pour le transport des endosomes axonaux, puisque lorsque l'une ou l'autre de ces protéines est inhibée par l'expression d'un dominant négatif, le transport rétrograde de la TeNT et des neurotrophines est bloqué. Rab5 joue un rôle durant les étapes précoces qui précèdent le transport et Rab7 joue un rôle dans la régulation du transport axonal. Ces protéines permettent donc de coupler l'endocytose dépendante de la clathrine au transport axonal rapide des endosomes contenant la TeNT et des neurotrophines (Figure 21) (Deinhardt, Salinas et al. 2006).

Le transport des endosomes axonaux est médié par le complexe dynéine-dynactine (Hafezparast, Klocke et al. 2003) et nécessiterait aussi la présence de la myosine (Lalli, Gschmeissner et al. 2003). Le pH à l'intérieur des endosomes axonaux reste neutre tout au long du transport, permettant ainsi la protection des protéines transportées (Bohnert and Schiavo 2005). Lorsque les endosomes arrivent dans le soma, le pH s'acidifie, permettant la libération du contenu des endosomes (Salinas, Bilisland et al. 2009).

Des expériences de colocalisation et de purification des endosomes axonaux réalisées avec le fragment Hc de la TeNT ont aussi permis de montrer que le poliovirus (Ohka, Sakai et al. 2009) et l'adénovirus canin CAV-2 étaient transportés par ces endosomes (Salinas, Bilisland et al. 2009). L'entrée de ces deux virus se produit aussi au niveau des jonctions neuromusculaires, où le poliovirus reconnaît le récepteur CD155 et CAV-2 le récepteur CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor). Ces virus sont ensuite co-intériorisés avec leur récepteur respectif et transportés dans les endosomes axonaux jusqu'au soma (Figure 17).

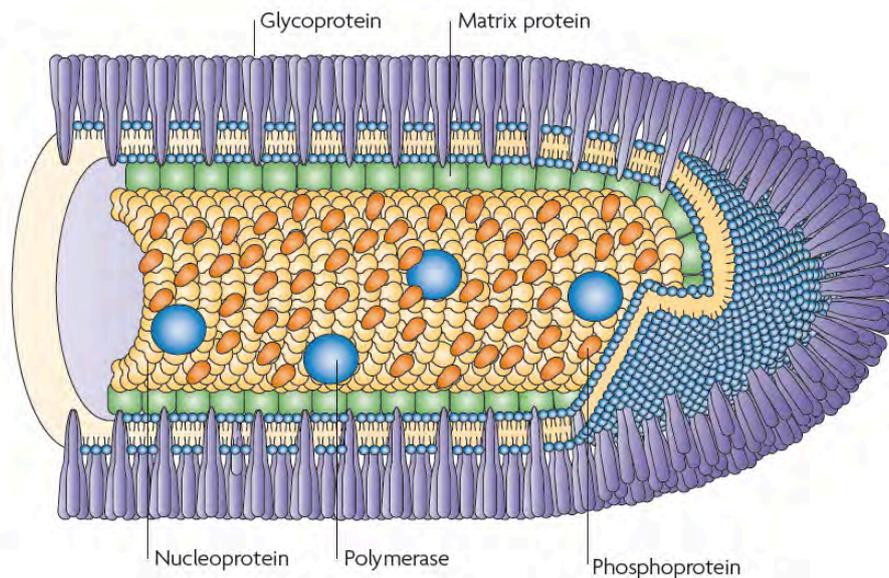


Figure 22 : Représentation schématique d'une particule virale du virus de la rage.

L'enveloppe virale est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle est enchâssée la glycoprotéine virale (violette). Sous l'enveloppe se trouve la protéine de matrice (vert). A l'intérieur de la particule virale se trouve la ribonucléoparticule (RNP) aussi appelée complexe de réplication. Cette RNP est composée de l'ARN génomique et des protéines virales indispensables à la réplication : la nucléoprotéine (jaune), la phosphoprotéine (orange) et la polymérase (bleu).

Schéma issu de Schnell. McGettigan et al. 2010

b- Transport vésiculaire : exemple du virus de la rage

Le virus de la rage fait partie de la famille des *Rhabdoviridae* au sein de l'ordre des *Mononegavirales* (Figure 22). Il présente un très large spectre d'hôte et peut infecter tous les animaux à sang chaud.

Il est le plus souvent inoculé à son hôte lors d'une morsure par un animal contaminé. Il pénètre dans le système nerveux au niveau des terminaisons nerveuses libres et des jonctions neuromusculaires, soit directement, soit après une courte étape de multiplication dans les cellules musculaires au niveau du site d'inoculation (Charlton, Nadin-Davis et al. 1997). La transmission du virus est ensuite strictement neuronale (Jackson 1994). Les nouvelles particules passent d'un neurone à l'autre par des phénomènes de transcytose au niveau des régions synaptiques (Woldehiwet 2002). Après avoir envahi le système nerveux central par voie centripète, le virus se dissémine dans des tissus extraneuraux par voie centrifuge et infecte notamment les glandes salivaires, le pancréas et les reins.

Le mode d'entrée du virus de la rage dans la cellule n'est pas bien compris, mais elle se produit vraisemblablement à la suite de la fixation du virus sur un récepteur. Plusieurs récepteurs capables d'interagir avec la glycoprotéine du virus de la rage ont été identifiés. Dans les neurones, par exemple, elle peut se lier au récepteur aux neurotrophines p75^{NTR}, à la molécule d'adhésion NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) ou au récepteur nicotinique à l'acétylcholine (NACHR) (Lentz, Burrage et al. 1983; Thoulouze, Lafage et al. 1998; Tuffereau, Benejean et al. 1998). Le virus entre ensuite dans les neurones par endocytose puis progresse dans les axones le long des MT (Ceccaldi, Gillet et al. 1989). Les modalités du transport axonal du virus de la rage ne sont pas très bien caractérisées. Comme ce virus utilise un récepteur aux neurotrophines pour son entrée par endocytose, il serait tentant de penser qu'il utilise les endosomes axonaux pour son transport dans les neurones. Cependant, des études supplémentaires seront nécessaires pour valider cette hypothèse.

Des études ont montré que la phosphoprotéine (P) pouvait interagir avec la chaîne légère des dynéines, DLC8 (Jacob, Badrane et al. 2000; Raux, Flamand et al. 2000), bien que l'implication de cette interaction dans le transport du virus de la rage soit controversée (Mebatsion 2001; Finke and Conzelmann 2005; Rasalingam, Rossiter et al. 2005; Tan, Preuss et al. 2007). L'interaction de la P avec DLC8 pourrait en effet permettre à la RNP virale de se lier à la dynéine et favoriserait ainsi son transport. Cependant, ceci nécessiterait au préalable un dé-enveloppement du virus et un relargage des RNP dans le cytoplasme. Or, des études menées avec un virus de la rage recombinant dont la protéine d'enveloppe G et une des protéines de la RNP sont couplées avec des fluorophores différents ont permis de montrer que le virus était transporté dans les axones sous forme enveloppée (Klingen, Conzelmann et al. 2008). De plus, un virus muté au niveau du site de fixation à DLC8 sur la P accède normalement au SNC, bien que la transcription des gènes précoces de ce virus soit fortement affectée. Ceci, suggère donc un rôle de l'interaction avec DLC8 durant la réplication virale plutôt que dans le transport axonal (Tan, Preuss et al. 2007).

La glycoprotéine ne présentant aucun site d'interaction avec des moteurs cellulaires, nous pouvons supposer que le virus est transporté dans une vésicule (Schnell, McGettigan et al. 2010). Afin de permettre le transport du virus sous sa forme enveloppée dans les axones, le pH à l'intérieur de la vésicule de transport doit être neutre. En revanche, l'acidification du pH est nécessaire pour permettre la libération de la RNP dans le cytoplasme (Gaudin, Ruigrok et al. 1993).

OBJECTIFS DE LA THESE

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, beaucoup d'interrogations subsistent concernant le cycle cellulaire du BDV. Une meilleure compréhension des différentes étapes du cycle viral est un préalable indispensable pour mieux appréhender la physiopathologie de l'infection par ce virus. En particulier, les mécanismes qui permettent le transport du virus dans les neurones sont mal compris. Ces mécanismes sont probablement très performants, puisque diverses équipes ont montré que le BDV a la capacité de se disséminer de façon très efficace et rapide dans le système nerveux central, ainsi que dans des cultures primaires de neurones ou des cultures organotypiques d'hippocampe. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était de mieux caractériser le cycle viral et notamment d'étudier les modalités du transport intracellulaire du BDV.

Pour étudier le transport intracellulaire du BDV, il nous a semblé important de développer des outils permettant d'analyser le trafic du virus en temps réel dans les cellules infectées. Ces outils pourraient servir à analyser certaines étapes clés du cycle de réplication du BDV, comme son adressage au noyau, l'assemblage des RNP ou encore la transmission du virus de cellule à cellule. Comme cela a été réalisé pour d'autres virus, ces études reposent en grande partie sur une analyse par imagerie à l'aide de virus recombinants fluorescents. En collaboration avec l'équipe du Pr Schwemmle de l'Université de Freiburg (Allemagne), nous avons donc cherché à construire un BDV recombinant dont l'un des constituants de la RNP serait fusionné à une protéine pouvant être visualisée par imagerie en fluorescence en temps réel.

Mon premier objectif de thèse a donc été de caractériser le virus recombinant obtenu et de développer les conditions expérimentales les plus adaptées pour son utilisation. J'ai ensuite réalisé une étude de la dynamique des constituants viraux par des approches de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) et de FLIP (Fluorescence Loss Induced by Photobleaching) et j'ai précisé les modalités du trafic intra et intercellulaire de ce virus (article sous presse).

La seconde partie de mon projet portait sur l'étude du transport axonal du BDV. J'ai notamment testé l'hypothèse selon laquelle le BDV serait transporté dans les axones par des endosomes axonaux, à l'instar d'autres pathogènes comme le CAV-2 et la TeNT. J'ai développé diverses approches méthodologiques pour aborder cette question. Celles-ci incluent : des analyses par immunofluorescence de colocalisation de protéines de la RNP du BDV avec d'autres cargos connus pour utiliser les endosomes axonaux comme la TeNT ; des purifications biochimiques de fractions enrichies en endosomes axonaux et le développement d'une nouvelle méthode de purification d'endosomes axonaux par cytométrie en flux en utilisant des cultures primaires de neurones infectées ou non par le BDV. Toutes ces approches, qui sont encore en cours de développement pour certaines, devraient permettre de déterminer si le BDV utilise réellement ce mode de transport vésiculaire dans les neurones et éventuellement sous quelle forme.

MATERIELS ET METHODES

I- Culture de neurones

Les neurones sont isolés à partir du cerveau d'embryons de rats Sprague-Dawley sacrifiés au 17^{ème} jour de vie embryonnaire. Après dissection des cortex ou de l'hippocampe sous loupe binoculaire, ceux-ci sont digérés par une incubation de 15 min à 37°C dans du PBS contenant 10 U/ml de papaïne (Worthington), puis dissociés mécaniquement par trituration dans du PBS contenant 1,5 mg/ml de sérum d'albumine de bovin (BSA) et 1,5 mg/ml d'inhibiteur de la trypsine. La suspension est ensuite passée au travers d'un filtre de 70µm et centrifugée à 1250rpm pendant 5 min. Après resuspension dans du milieu Neurobasal, la suspension cellulaire est déposée sur un coussin de 4mL de BSA diluée à 4% dans du milieu Neurobasal, puis centrifugée à 1250rpm pendant 10min. Ce coussin permet de séparer les neurones (plus gros) des cellules gliales. Le culot cellulaire est enfinensemencé sur un support matriciel recouvrant les puits de culture. Celui-ci est composé de polyornithine (0,5mg/ml) diluée dans de l'eau stérile incubée la veille, qui a ensuite été remplacée par de la laminine (5µg/ml) diluée dans du Neurobasal.

Les neurones corticaux sont cultivés à 37°C en présence de 5% de CO₂, dans du milieu Neurobasal complétementé avec 2% de B-27, 2 mM de L-Glutamine et 500 ng/ml de Normocine.

Les neurones d'hippocampe sont cultivés dans ce même milieu complétementé par 1% de sérum de veau foetal (SVF). Afin d'éviter le développement des cellules gliales contaminantes, le milieu est complétementé avec 50 µg/ml de 5-Fluorouracil et 10 µg/ml d'uridine 24h après la mise en culture. Enfin, 72h après, la moitié du milieu est remplacée par du milieu frais.

Les neurones sont infectés ou non par la souche sauvage du BDV He80 à une multiplicité d'infection de 0,003 dès leur mise en culture.

Pour les études de colocalisation, les neurones corticaux ou hippocampaux sont cultivés en basse densité sur des lamelles de verre (30 000 neurones/lamelles). Afin de faciliter la survie des neurones cultivés à basse densité, la moitié du milieu a été pré-conditionnée par un passage de 24h sur des cultures primaires de cellules gliales. Ces neurones sont utilisés 8 à 10 jours après leur mise en culture.

Pour les expériences de purification des endosomes axonaux, les neurones corticaux sont cultivés à forte densité (5×10^6 neurones/boîte de 10 cm) et utilisés 13 jours après leur mise en culture.

II- Production de BDV

Le BDV est préparé à partir de cellules Vero infectées de façon persistante, cultivées à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) complété par 10% de sérum de veau foetal. Afin d'induire un choc osmotique et stimuler le relargage viral, le milieu de culture est remplacé par un premier tampon contenant 20mM HEPES (HydroxyEthyl PiperazineEthaneSulfonic) à pH 7,4, puis par un deuxième tampon contenant 20mM HEPES + 250mM MgCl₂ + 1% SVF pendant 1h30 à 37°C. Le surnageant est ensuite clarifié par deux centrifugations à 2500 rpm durant 10 min à 4°C et filtré à 0,45 µm. Puis, afin de concentrer le virus, il est déposé sur un coussin de sucrose 20% et ultracentrifugé à 24 000 rpm, pendant 1h10 à 4°C. Enfin, les culots contenant le virus sont resuspendus dans du milieu Neurobasal. Le virus est conservé à -80°C.

Le titrage est réalisé sur des cellules Vero non infectées,ensemencées la veille sur des lamelles de verre. Le BDV est dilué en série de 10⁻¹ à 10⁻⁶ dans du milieu puis distribué à raison de 200 µl par lamelle, en duplicat. Les cellules sont incubées 72h à 37°C et fixées, puis les cellules infectées sont détectées par le marquage de la protéine N par immunofluorescence. Les foyers d'infection sont comptés au microscope à fluorescence. Pour chaque dilution, la moyenne des deux lamelles est effectuée. Puis, la moyenne de toutes les dilutions comptées est réalisée en prenant en compte chaque facteur de dilution.

III- Marquage des endosomes axonaux avec le fragment Hc de TeNT ou la sous unité B de la toxine cholérique (CT-B)

Marquage pour les études de colocalisation :

Les neurones sont marqués avec le fragment Hc-555, qui provient du laboratoire de Giampietro Schiavo (London Research Institute, UK).

Le milieu de culture est remplacé par le Hc-555 dilué dans du milieu Neurobasal (C=10nM) préchauffé à 37°C. Après une incubation de 1h à 37°C, les neurones sont lavés 2 fois avec du milieu Neurobasal.

Marquage pour le tri des endosomes axonaux

Les neurones sont marqués avec la sous unité B de toxine cholérique couplée à l'Alexa Fluor 488, appelée CT-B-488 (Molecular Probes).

Le milieu de culture est remplacé par CT-B-488 dilué dans du neurobasal (C=100ng/ml) préchauffé à 37°C. Après une incubation de 3h à 37°C, les neurones sont incubés sur glace pendant 10 min puis lavés pendant 1 min avec une solution de lavage acide (acide citrique 100 nM, NaCl 142 nM, à pH 2) et 2 fois avec du Hanks Buffered Salt Solution (HBSS). Cette étape permet d'éliminer toute la toxine fixée sur les récepteurs mais qui n'a pas encore été internalisée.

IV- Immunofluorescence

Les cellules sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 2 % pendant 10 minutes et de 4 % pendant 10 minutes supplémentaires. Puis elles sont perméabilisées pendant 4 minutes dans une solution de PBS contenant 0,1 % de Triton X100. Elles sont ensuite lavées dans du PBS et les sites de fixation non spécifiques sont bloqués avec 2,5% de sérum de chèvre pendant 1h. Le marquage est effectué pendant 1h par incubation avec les anticorps primaires anti-N ou anti-P de lapin et anti- β III tubuline de souris. Ces anticorps sont dilués au 1/1000ème dans du PBS contenant 2,5 % de sérum de chèvre. Après trois lavages (dont le premier avec du PBS-Triton-X100), les cellules sont mises en présence des anticorps

secondaires anti-lapin Alexa Fluor 488 et anti-souris Alexa Fluor 633. Enfin, les lamelles lavées avec du PBS sont montées sur lame de verre avec le milieu de montage Vectashield contenant du DAPI (4',6-DiAmidino-2-Phénylindole).

Les photos sont prises au microscope confocal (Carl Zeiss LSM 710) équipé de l'objectif 63 X puis la colocalisation est analysée grâce au logiciel Image J.

V- Préparation des extraits neuronaux

Nous avons réalisé un protocole selon deux conditions, qui préservait ou non l'intégrité des endosomes au cours de la lyse.

Lyse cellulaire ménagée :

Après deux lavages dans du Hanks Buffered Salt Solution (HBSS) pH 7,2, les neurones sont récoltés sur glace dans une solution d'HBSS additionnée d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche). Après une centrifugation de 5 minutes à 170g à 4°C, le culot cellulaire est resuspendu dans du « Breaking Buffer » (BB), composé de 10 mM d'Hepes-KOH pH 7,2, 0,25M de sucrose, 1 mM d'EDTA, 1 mM d'acétate de magnésium et contenant des inhibiteurs de protéases (Complete). Les neurones subissent ensuite une lyse ménagée grâce au passage de la suspension cellulaire dans un cell-cracker (EMBL Technology Transfer, GmbH). Cet outil possède un cylindre d'un diamètre donné, dans lequel est insérée une bille, en fonction du diamètre de bille choisi, les structures cellulaires plus ou moins grandes seront lysées. Pour nos expériences nous avons choisi une bille de 8,002µm de diamètre, permettant de préserver les organites d'une taille inférieure à 18 µm. Ce lysat est ensuite centrifugé 15 minutes à 690g à 4°C dans le but d'éliminer les débris cellulaires.

Lyse cellulaire totale :

Après deux lavages avec du PBS à 4°C, les neurones sont récoltés dans du PBS et centrifugés 5 minutes à 170g à 4°C. Le culot cellulaire est suspendu dans une solution contenant 500 mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 0,1% de SDS, 1% de NP40, 0,5% de sodium Deoxycholate, 1mM d'orthovanadate de sodium et d'inhibiteurs de protéases (Complete) et incubé pendant 30 minutes dans de la glace. Afin d'éliminer les débris cellulaire, le lysat est centrifugé à 4°C pendant 20 minutes à 16000 g.

VI- Immunoprécipitation

Préalablement, des billes magnétiques sont couplées à l'anticorps anti-panTrk (reconnaissant toutes les isoformes des récepteurs Trk, Santa Cruz). Pour cela, 100 µl de billes sont additionnées de 4 µg d'anticorps, dilués dans 300 µl de solution de resuspension et incubées pendant une heure à 4°C sur une roue. En parallèle, afin d'éliminer les protéines qui pourraient interagir de façon non spécifique avec les billes magnétiques, les lysats neuronaux préparés précédemment sont incubés avec des billes magnétiques pendant 30 minutes à 4°C sur une roue. Le lysat est ensuite clarifié par un passage sur un aimant qui retient les billes magnétiques. Ce lysat clarifié est alors incubé pendant 3 heures à 4°C sur une roue avec les billes couplées à l'anticorps anti-panTrk préparées au préalable. Après 4 lavages avec la solution de resuspension des extraits neuronaux, les protéines fixées aux billes sont éluées et dénaturées par addition d'une solution de Laemmli chauffée à 95°C.

Les immunoprécipitations ont aussi été réalisées à l'aide d'anticorps anti-panTrk couplé à des billes d'agarose.

Anticorps	Tampon de Blocage des membranes	Dilution	Tampon de dilution	Fournisseur
Anticorps primaires				
anti-panTrk	Tampon Odyssey	1/1000	1/2 Odyssey 1/2TBS-T	Cell Signaling
anti-Rab7	Tampon Odyssey	1/500	1/2 Odyssey 1/2TBS-T	Cell Signaling
anti-N	Tampon Odyssey	1/100000	1/2 Odyssey 1/2TBS-T	Préparé au laboratoire
anti-P	Tampon Odyssey	1/100000	1/2 Odyssey 1/2TBS-T	Préparé au laboratoire
anti-X	Tampon Odyssey	1/10000	1/2 Odyssey 1/2TBS-T	Préparé au laboratoire
anti-G	TBS + 5% lait	1/5000	TBS-T 0,25% + 5% lait	Préparé au laboratoire
anti-M	TBS + 5% lait	1/2000	TBS-T 0,1% + 5% lait	Préparé au laboratoire
anti-calnexine	Tampon Odyssey	1/1000	1/2 Odyssey 1/2TBS-T	Enzo Life Sciences
anti-ERGIC	Tampon Odyssey	1/1000	1/2 Odyssey 1/2TBS-T	Sigma-Aldrich
anti-GM130	Tampon Odyssey	1/1000	1/2 Odyssey 1/2TBS-T	BD Biosciences
Anticorps secondaires				
anti-lapin CF680 ou	/	1/1000	1/2 Odyssey 1/2TBS-T	Biotium

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés en western-blot.

VII- Tri des endosomes par FACS

Après marquage avec la sous-unité B de toxine cholérique, les neurones subissent le protocole de lyse ménagée. Les extraits neuronaux sont ensuite dilués dans du BB, puis triés avec le FACSARIA II SORP ou avec le Cyto/Trieur Cellulaire BD Fascalibur par les ingénieurs de la plateforme Tri Toulouse. Ces cytomètres sont préalablement calibrés avec le mélange de bille Biocytex (0.5, 0.9, 3µm couplé au FITC, Stago) et avec des extraits neuronaux non marqués avec CT-B-488. Les extraits récupérés sont ensuite dénaturés par addition d'une solution de Laemmli.

VIII- Gels de protéines et immunodétection (Western blot)

Les échantillons protéiques sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Biorad). Les protéines sont ensuite transférées sur des membranes de nitrocellulose par électrotransfert puis sont colorées avec du rouge Ponceau afin de vérifier l'efficacité du transfert. Le blocage des membranes a été réalisé différemment selon l'anticorps primaire utilisé (Tableau 1). Les membranes sont ensuite incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires (Tableau 1). Après 3 lavages de 5 minutes avec du TBS 1X (Tris-Buffered Saline) contenant 0,1% de Tween-20, suivi de 3 lavages de 5 minutes avec du TBS 1X, la membrane est incubée pendant 1h à l'obscurité avec les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes émettant dans l'infrarouge. Après des lavages identiques aux précédents, la révélation des signaux est réalisée avec le scanner Odyssey (LI-COR Biosciences).

RESULTATS

I- Analyse du trafic intracellulaire du BDV en utilisant un virus codant pour une phosphoprotéine couplée avec un motif tétracystéine.

Cette partie fait l'objet d'un article qui a été sous presse dans « Journal of Virology », le 26 avril 2013 :

« Analysis of Borna disease virus trafficking in live infected cells using a virus encoding a tetracysteine-tagged P protein. »

Caroline M. Charlier, Yuan-Ju Wu, Sophie Allart, Cécile E. Malnou, Martin Schwemmle et Daniel Gonzalez-Dunia

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'analyse des modalités du transport intracellulaire viral repose souvent sur la construction de virus recombinants dont une ou plusieurs des protéines virales sont couplées à une protéine fluorescente telle que la GFP. Cet outil permet d'analyser le transport du virus dans les cellules par imagerie en temps réel. Dans le cas du BDV, les approches de génétique inverse ont permis de construire des BDV recombinants contenant un cadre de lecture supplémentaire codant pour la GFP (Schneider, Ackermann et al. 2007; Daito, Fujino et al. 2011). Ces virus ont permis de visualiser la progression de l'infection virale au sein de cultures cellulaires, ainsi que dans le SNC de rongeur. Cependant, comme la GFP n'est couplée à aucune des protéines virales, ces virus recombinants ne sont pas adaptés pour l'analyse du trafic intracellulaire du BDV.

Nous avons donc cherché à produire un BDV recombinant dont une des protéines de la RNP serait fusionnée à une protéine pouvant être visualisée par imagerie en fluorescence. Cette étape du travail a été réalisée en collaboration avec Yuan-Ju Wu et Martin Schwemmle de l'Université de Freiburg (Allemagne) qui disposent du système de génétique inverse du BDV. Ils ont dans un premier temps cherché à produire des virus recombinants comportant une des protéines de la RNP fusionnée à la GFP, que ce soit à l'extrémité N ou C-terminale. Toutes ces tentatives n'ont pas permis d'obtenir de virus viable. Nous supposons que la taille de la GFP est trop importante et pourrait empêcher le bon assemblage des RNP.

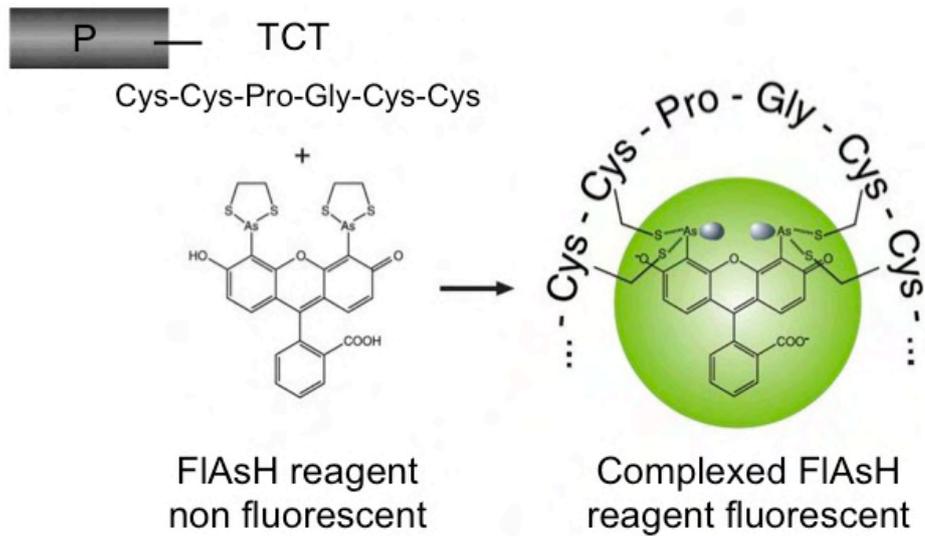


Figure 23. Principe du marquage FIASH

Un motif tétracystéine (TCT) est inséré à l'extrémité C-terminale de la protéine P. Ce motif est non fluorescent mais il le devient lorsque le réactif FIASH (en vert) se fixe de façon covalente aux résidus thiol présents à la surface des cystéines.

Une approche récente offre une alternative intéressante à l'utilisation de la GFP. Celle-ci repose sur l'insertion d'une séquence -CCXXCC- appelée motif tétracystéine (TCT) en phase avec un gène codant une protéine virale (Griffin, Adams et al. 1998). Ce motif, composé de seulement six acides aminés, est beaucoup plus petit que la GFP (238 acides aminés), ce qui minimise les risques de perturbation de la structure ou des propriétés de la protéine dans laquelle il est inséré. Ce motif, qui comporte 4 résidus cystéine, possède en outre la propriété d'interagir de façon covalente avec un réactif bi-arsenic dérivé de la fluorescéine, qui devient alors fluorescent (Figure 23). Ces réactifs sont nommés FIAsH ou ReAsH et émettent respectivement de la fluorescence verte ou rouge. Cette technique de marquage a été utilisée ces dernières années pour produire différents virus recombinants dont le trafic dans les cellules a pu être étudié par imagerie en temps réel. Elle a notamment permis de marquer plusieurs protéines virales, telles que la protéine NS1 du virus de la grippe (Li, Lu et al. 2010), la protéine de matrice du virus de la stomatite vésiculaire (Das, Panda et al. 2009) ou encore les protéines gag ou l'intégrase du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Arhel, Genovesio et al. 2006; Gousset, Ablan et al. 2008).

Nous avons donc cherché à produire un virus recombinant comportant un motif tétracystéine couplé à l'une des protéines de la RNP. Dans ce cas également, aucun virus viable n'a pu être obtenu. Seul l'ajout combiné d'une étiquette Flag puis du motif tétracystéine à l'extrémité C-terminale de la P a permis d'obtenir un virus viable. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer qu'il ait été nécessaire d'insérer l'étiquette Flag pour que le virus soit infectieux : tout d'abord le Flag pourrait jouer le rôle d'un espaceur, éloignant ainsi le motif TCT du reste de la séquence de la P, ce qui favoriserait l'assemblage de la RNP. Par ailleurs, le caractère hydrophile de l'étiquette Flag pourrait compenser l'hydrophobicité du motif tétracystéine, permettant là encore un assemblage correct des RNP.

Le virus recombinant obtenu a été nommé rBDV-P-Flag-TCT et a été utilisé pour établir une lignée de cellules Vero infectées de façon persistante, nommée Vero rBDV-P-Flag-TCT.

Ce nouveau virus recombinant a ensuite été caractérisé. Nous avons pu observer que malgré un retard de dissémination au début de l'infection par rapport au virus recombinant sauvage rBDV, le virus rBDV-P-TCT infecte la totalité de la culture au bout de 45 jours. La quantité des ARN subgénomiques du virus rBDV-P-Flag-TCT

est légèrement différente de celle du rBDV mais n'affecte pas la synthèse des protéines virales N et P. Nous avons donc réussi à obtenir un virus recombinant viable dont les caractéristiques sont proches du virus sauvage.

Dans le but de visualiser le trafic intracellulaire du BDV, nous avons réalisé les premiers essais de marquage des cellules Vero rBDV-P-TCT. La comparaison du marquage dans les cellules non infectées et les cellules rBDV-P-TCT a révélé la présence d'un marquage réticulé périnucléaire retrouvé à la fois dans les cellules infectées et non infectées. Ce marquage, non spécifique, pourrait s'apparenter à celui du réseau mitochondrial. Nous avons donc optimisé le marquage en ajustant différents paramètres, comme la concentration en réactif FIAsh ou le temps de marquage, mais aussi en augmentant considérablement la stringence des lavages avec du 2,3 Dimercapto-1-propanol, un agent chélateur. Ceci nous a permis d'éliminer totalement le marquage non spécifique et d'obtenir un marquage caractéristique d'une infection par le BDV, ponctiforme dans le noyau et diffus dans le cytoplasme. La spécificité du marquage a également été confirmée par des études de colocalisation entre le marquage de la protéine P réalisé avec le réactif FIAsh et celui réalisé par immunofluorescence.

Cette optimisation des conditions de marquage FIAsh nous a alors permis de réaliser des études de la dynamique du virus par imagerie en temps réel en utilisant les cellules Vero rBDV-P-TCT. De façon surprenante, nous avons constaté que les structures ponctiformes nucléaires, caractéristiques de l'infection par le BDV, étaient extrêmement statiques durant des périodes d'observation très longues, allant jusqu'à 10 h. Ces structures, appelées vSPOT, étant le site de réplication et transcription du BDV, nous pensions en effet qu'elles seraient plus mobiles. Nous avons donc analysé plus en détail la dynamique de la protéine P dans ces structures par des approches de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) et de FLIP (Fluorescence Loss Induced by Photobleaching).

Dans les vSPOT, les analyses de FRAP révèlent un retour partiel de la fluorescence. Ceci nous indique que la protéine P est séparée en deux fractions : une fraction mobile et une fraction statique. Le coefficient de diffusion dans les vSPOT est égal à $0.190\mu\text{m}^2/\text{s}$, ce qui est très proche de ce qui a été précédemment décrit pour des protéines associées aux nucléosomes telles que HMG-17 et est

inférieur à celui retrouvé pour des protéines libres dans le noyau, suggérant que la P dans le noyau est en interaction avec une protéine nucléaire.

Dans le cytoplasme, nous pouvons observer un retour total de la fluorescence après photo-blanchiment et la protéine P se déplace avec un coefficient de diffusion élevé ($D=1,335 \mu\text{m}^2/\text{s}$), suggérant qu'elle est très mobile dans le cytoplasme.

L'analyse des expériences de FLIP montre que la protéine P est échangée en permanence entre les différents vSPOT dans le noyau. Ces échanges ne sont pas restreints au noyau, puisque le photo-blanchiment continu du cytoplasme entraîne une diminution de la fluorescence dans tous les compartiments cellulaires, suggérant ainsi un échange permanent de la protéine P entre les vSPOT, le nucléoplasme et le cytoplasme.

Ces expériences, en plus de nous avoir apporté des données importantes sur la dynamique de la protéine P dans la cellule, nous ont aussi permis de développer une nouvelle méthode d'imagerie : le FLIP utilisant le microscope bi-photonique. En effet, le microscope confocal que nous avons utilisé pour toutes les expériences d'imagerie, entraîne un photo-blanchiment sur toute la trajectoire du laser, touchant ainsi le cytoplasme, le nucléoplasme et les vSPOT. Comme les expériences de FLIP nécessitent un photo-blanchiment constant, ceci pouvait entraîner un biais dans les résultats portant sur la dynamique de la P dans le noyau et dans le nucléoplasme. Il nous a donc fallu développer une autre méthode permettant ne toucher que notre compartiment d'intérêt. Nous avons alors choisi la microscopie bi-photonique qui n'entraîne un photo-blanchiment qu'au niveau de la région focale.

Nous avons ensuite observé la lignée de cellules Vero rBDV-P-Flag-TCT ou des cellules en début d'infection, par imagerie en temps réel. Le marquage FIAsH étant très photosensible, nous avons dû adapter les conditions d'acquisition des images pour pouvoir réaliser des films de plusieurs heures.

Dans la lignée de cellules Vero rBDV-P-Flag-TCT, nous avons observé du matériel viral fluorescent en mouvement dans le cytoplasme, qui pourrait correspondre à des RNP, ainsi que l'accumulation de matériel viral au niveau de la membrane plasmique séparant deux cellules infectées. Dans certaines cellules, nous avons observé un échange de matériel viral qui entre dans le cytoplasme de la cellule voisine, puis est adressé au noyau.

Enfin, nous avons visualisé les étapes précoces de l'infection. Pour cela deux méthodes d'infection étaient possibles : soit les cellules pouvaient être infectées avec du virus libre préalablement marqué avec le réactif FIAsh ; soit elles pouvaient être infectées par contact avec les cellules Vero rBDV-P-Flag-TCT. Après avoir testé les deux approches, nous avons décidé d'infecter nos cellules par coculture. En effet, le BDV produit très peu de particules virales libres et les lavages lors du marquage FIAsh entraînaient encore une diminution de cette quantité. Il fallait donc produire beaucoup de virus pour n'obtenir que très peu de particules virales marquées. Grâce aux expériences réalisées par coculture, nous avons visualisé pour la première fois un phénomène d'infection par le BDV, depuis l'étape d'entrée dans le cytoplasme jusqu'à l'adressage de la RNP au noyau.

Pour conclure, nous avons réussi à construire le premier BDV fluorescent que l'on peut suivre dans une cellule par imagerie en temps réel. L'ensemble des travaux réalisés avec le virus recombinant rBDV-P-Flag-TCT dans les cellules Vero nous a permis de mieux comprendre la dynamique du BDV dans les cellules infectées de façon persistante, mais aussi durant les phases précoces de l'infection. L'analyse plus précise de la dynamique de la protéine P au niveau des structures ponctiformes nucléaires, complétée par les études de Matsumoto et son équipe portant sur l'analyse de la dynamique de la N, nous permettent de mieux comprendre comment sont organisées les différentes protéines virales à l'intérieur des vSPOT. Cette analyse permet aussi d'apporter des arguments supplémentaires en faveur de l'hypothèse que ces structures seraient le site de réplication du BDV (Matsumoto, Hayashi et al. 2012).

ARTICLE :

Analysis of Borna disease virus trafficking in live infected cells using a virus encoding a tetracysteine-tagged P protein.

Caroline M. Charlier, Yuan-Ju Wu, Sophie Allart, Cécile E. Malnou, Martin Schwemmle et Daniel Gonzalez-Dunia

Sous presse, "Journal of Virology" le 24 avril 2013

1 **Analysis of Borna disease virus trafficking in live infected cells**
2 **using a virus encoding a tetracycline-tagged P protein**

3
4 Caroline M. Charlier^{1,2,3§}, Yuan-Ju Wu^{4,5§#}, Sophie Allart^{1,2,3,6}, Cécile E. Malnou^{1,2,3},
5 Martin Schwemmle⁴ and Daniel Gonzalez-Dunia^{1,2,3*}

6 ¹Inserm, UMR1043, Toulouse, France; ²CNRS, UMR5282, Toulouse, France;
7 ³Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan
8 (CPTP), Toulouse, France; ⁴Department of Virology, Institute for Medical
9 Microbiology and Hygiene, ⁵Spemann Graduate School of Biology and Medicine,
10 University of Freiburg, D-79104 Freiburg, Germany; ⁶Imaging core facility, Inserm,
11 UMR1043, Toulouse, France.

12

13 Running title: Live imaging of tetracycline-tagged BDV

14

15 *Corresponding author. Address: Inserm UMR 1043, CPTP Bât B, CHU Purpan, BP
16 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France; Phone: +33 5 6274 4511; Fax: +33 5 6274
17 4558

18 Email: daniel.dunia@inserm.fr

19

20 § These authors contributed equally to this work

21 # Present address: NeuroCure Cluster of Excellence, Charité Universitätsmedizin,
22 Berlin, Germany.

23

24 Word count:

25 Abstract: 230 words; Text (excluding references and legends): 6,191 words

ABSTRACT

26

27

28 Borna disease virus (BDV) is a non-segmented, negative stranded RNA virus
29 characterized by non-cytolytic persistent infection and replication in the nucleus of
30 infected cells. To gain further insight on the intracellular trafficking of BDV
31 components during infection, we sought to generate recombinant BDV (rBDV)
32 encoding fluorescent fusion viral proteins. We successfully rescued a virus bearing a
33 tetracysteine tag fused to BDV-P protein, which allowed assessing the intracellular
34 distribution and dynamics of BDV using real-time live imaging. In persistently infected
35 cells, viral nuclear inclusions, representing viral factories tethered to chromatin,
36 appeared extremely static and stable, contrasting with a very rapid and active
37 trafficking of BDV components in the cytoplasm. Photo-bleaching (FRAP and FLIP)
38 imaging approaches revealed that BDV components were permanently and actively
39 exchanged between cellular compartments, including within viral inclusions, albeit
40 with a fraction of BDV-P protein not mobile in these structures, presumably due to its
41 association with viral and/or cellular proteins. We also evidenced transfer of viral
42 material between persistently infected cells, with routing of the transferred
43 components towards the cell nucleus. Finally co-culture experiments with non-
44 infected cells allowed visualizing cell-to-cell BDV transmission and movement of the
45 incoming viral material towards the nucleus. Our data demonstrate the potential of
46 tetracysteine-tagged recombinant BDV for virus tracking during infection, which may
47 provide novel information on the BDV life cycle and on the modalities of its interaction
48 with the nuclear environment during viral persistence.

INTRODUCTION

49

50

51 Borna disease virus (BDV) is an enveloped virus with a non-segmented, negative
52 strand RNA genome (1, 2), which represents the prototypic member of the family
53 *Bornaviridae*. In contrast to other *Mononegavirales* members, BDV replicates in the
54 nucleus of infected cells (3) and uses the host cell splicing machinery for maturation
55 of viral transcripts (4, 5). The BDV compact genome encodes for six proteins,
56 namely, the nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), protein X, matrix protein (M),
57 glycoprotein (G), and polymerase (L). Whereas M and G are involved in particle
58 formation, P, N, and L are components of the ribonucleoprotein complex (RNP). The
59 small X protein has been shown to contribute to apoptosis resistance during infection
60 (6) and may also have interferon antagonist activities (7). BDV persistently infects a
61 wide range of mammalian and avian species (8-11), resulting in a large spectrum of
62 neurological disorders ranging from immune-mediated diseases to behavioral
63 syndromes without inflammation (8, 12, 13). BDV is highly neurotropic, but can also
64 replicate in other cells of the central nervous system (CNS), as well as in many
65 established cell lines in vitro (9).

66 To date, the BDV cell cycle remains poorly characterized. It is known that BDV enters
67 cells by receptor-mediated endocytosis and that pH-dependent fusion is required to
68 liberate the RNP into the cell environment (14-16). The post-entry events are
69 however still ill defined. In particular, the mechanisms of BDV movement to the
70 nucleus are totally unknown. Once inside the nucleus, BDV replicates without any
71 associated cytopathic effect and establishes a long-lasting, persistent infection. It
72 was shown recently that BDV assembles viral factories closely associated to

73 chromatin within the nucleus, which are essential to achieve intranuclear persistence
74 (17). A key issue, however, is to obtain more information on the relationship between
75 viral nuclear inclusions and the other cellular compartments. A better understanding
76 of the dynamics of BDV intracellular movements in infected cells would undoubtedly
77 provide novel information on the life cycle of this unique non-cytolytic, nuclear
78 replicating RNA virus.

79 In the past few years, the use of fluorescently labeled viruses and high-resolution
80 microscopy has proven its great interest for unraveling the dynamic events of virus
81 infection in living cells. Many diverse aspects of virus biology and virus-host cell
82 interplay have been examined, including viral entry or intracellular trafficking of viral
83 ribonucleocapsids. Classically, fluorescent *Mononegavirales* have been generated by
84 fusing GFP (or any related variant) in frame with a structural protein in a genomic
85 plasmid. Upon recombinant virus rescue, the resultant virus is fluorescent, due to
86 incorporation of the GFP fusion protein, thereby allowing live tracking as described
87 for VSV or rabies virus (18, 19). More recently, many groups have sought to use
88 alternatives to GFP tagging, because the relatively large size of GFP may potentially
89 alter the normal trafficking of viral components. In particular, many have used the
90 tetracysteine technology, initially described by Tsien et al. (20), which consists in
91 adding a small peptide sequence containing two pairs of cysteines (-CCXXCC-) to
92 the protein of interest. Subsequent fluorescent labeling of a recombinant virus results
93 from the capacity of this tetracysteine tag (TCT) to bind to fluorescent bi-arsenical
94 derivatives (e.g., FIAsh). Because of its small size, TCT appears as the ideal label in
95 virus studies and has been applied to a wide spectrum of viral systems (21).

96 In this work, our objective was to generate a recombinant BDV (rBDV) suitable for

97 live imaging studies and to use this virus to gain further insight on the BDV life cycle.
98 Reverse genetic approaches applied to BDV have demonstrated that GFP can
99 readily be inserted in the viral genome as an additional gene, thereby allowing the
100 visualization of BDV dissemination in the CNS (22, 23). Here, we aimed at inserting a
101 fluorescent label in the context of a fusion construct with a structural protein. In
102 particular, we tested insertions within N, P and L, the components of BDV RNP,
103 using GFP and TCT fluorescent tags. Among all recombinant viruses tested, we
104 succeeded in the rescue of a virus encoding TC-tagged P. Upon characterization,
105 this recombinant virus allowed real-time visualization of BDV dynamics in infected
106 cells.

MATERIALS AND METHODS

107

108

109 **Cells.** Vero and HEK293 cells (obtained from the American Type Culture Collection),
110 as well as Vero cells persistently infected with recombinant viruses (rBDV-Pwt, rBDV-
111 P-Flag and rBDV-P-Flag-TCT) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium-
112 high glucose supplemented with 10 % fetal calf serum.

113

114 **Plasmid construction.** Full-length BDV antigenomes harboring Flag- or TCT-tags
115 were generated by overlapping PCR amplification of the BDV antigenome plasmid
116 (pBRCMV-H1BDVc) (24). The procedure for inserting the different tags is briefly
117 detailed below: (i) Insertion of tags in BDV-P: In a first PCR reaction, we amplified
118 part of the P-ORF with a forward primer (prP/F) complementary to the BDV-P
119 sequence upstream of the unique restriction site *BbvCI* and a reverse primer (prP-
120 tag/R) containing the tag sequence. A second PCR reaction was performed with a
121 forward primer (prP-tag/F) containing the tag sequence and a reverse primer (prP/R)
122 complementary downstream of the restriction site *PmeI*. These two PCR products
123 then served as templates for a third PCR reaction to amplify a fragment containing
124 the Flag-tagged ORF using the forward prP/F and reverse primers prP/R. Finally, the
125 *BbvCI/PmeI* digested PCR product was ligated into a *BbvCI/PmeI* digested full length
126 BDV antigenome vector. (ii) Insertion of tags in BDV-N: A first PCR product was
127 amplified with a forward primer prN/F upstream of the unique restriction site *SpeI* and
128 a reverse primer (prtag-N/R) containing the tag sequence and the 3' end of the N-
129 ORF. A second PCR reaction was performed with a forward primer (prtag-N/R) and a
130 reverse primer (prN/R) downstream of the restriction site *MluI*. These two PCR

131 products served as templates for a third PCR reaction, amplified with primers prN/F
132 and prN/R. Finally, the *SpeI/MluI* digested PCR product was ligated into a *SpeI/MluI*
133 digested full length BDV antigenome vector. (iii) Insertion of tags in BDV-L: A first
134 PCR product was amplified with a forward primer prL/F upstream of the unique
135 restriction site *BstXI* and a reverse primer (prL-tag/R) containing the 5' end of the L-
136 ORF and the tag sequence. A second PCR reaction was performed with a forward
137 primer (prL-tag/R) and a reverse primer (prL/R) downstream of the restriction site
138 *NotI*. These two PCR products served as templates for a third PCR reaction,
139 amplified with primers prL/F and prL/R. Finally, the *BstXI/NotI* digested PCR product
140 was ligated into a *BstXI/NotI* digested full length BDV antigenome vector. (iv)
141 Insertion of GFP tags: The GFP ORF was amplified by PCR from pCA-Flag-GFP
142 plasmid with a forward and reverse primer consisting of the corresponding nucleotide
143 sequences (~40 nt) at the GFP N- and C- terminal fusion sites (prP-GFP/F and prP-
144 GFP-BDV/R, respectively). A second PCR reaction was done, using the BDV
145 plasmid (pBRCMV-H1BDVc) as a template and the forward primer (prP/F) and a
146 reverse primer (prP-GFP/R) complementary to prP-GFP/F. The BDV plasmid served
147 as the template for a third PCR reaction that was performed with a forward primer
148 (prP-GFP-BDV/F) complementary to prP-GFP-BDV/R and the reverse primer
149 (prP/R). To incorporate these three PCR products together, two other successive
150 PCR reactions were performed. One was amplified with prP/F and prP-GFP-BDV/R
151 as primers, and GFP and P ORF PCR products as templates. This PCR product
152 along with the product from the third PCR reaction served as templates for the final
153 PCR reaction with the primers prP/F and prP/R. Lastly, the *BbvCI/PmeI* digested final
154 PCR product was ligated into a *BdvCI/PmeI* digested full length BDV antigenome
155 vector. The same strategy was applied to produce a full length BDV antigenome

156 coding for GFP-N. The forward (prBDV-GFP-N/F) and reverse (prGFP-N/R) primers
157 used to amplify the GFP protein were containing nucleotide sequences at the GFP-N
158 fusion sites. A second PCR reaction was performed with the forward primer (prN/F)
159 and a reverse primer (prBDV-GFP-N/R). A third PCR reaction was performed with a
160 forward primer (prGFP-N/F) and a reverse primer (prN/R). The first two products
161 served as templates for a fourth PCR reaction, amplified by primers prN/F and
162 prGFP-N/R. This PCR product along with the third PCR product served as templates
163 for the final PCR reaction amplified by primers prN/F and prN/R. Lastly, the *SpeI/MluI*
164 digested final PCR product was ligated into a *SpeI/MluI* digested full-length BDV
165 antigenome vector. To generate a full length BDV antigenome expression plasmid
166 coding for L-GFP, GFP ORF was amplified with primers prL-GFP/F and prL-GFP-
167 BDV/R. Then, a second PCR reaction was performed with the forward primer prL/F
168 and a reverse primer (prL-GFP/R). A third PCR reaction was performed with a
169 forward primer (prL-GFP-BDV/F) and the reverse primer prL/R. The first two PCR
170 products served as templates for a fourth PCR reaction amplified by primers prL/F
171 and prL-GFP-BDV/R. This PCR product along with the third PCR product served as
172 templates for the final PCR reaction amplified by primers prL/F and prL/R. Lastly, the
173 *BstXI/NotI* digested final PCR fragment was ligated into a *BstXI/NotI* digested full
174 length BDV antigenome vector.

175

176 **BDV rescue.** HEK 293T cells grown in 35-mm dishes were transfected with 4 µg of
177 plasmids encoding the full length BDV antigenome (pBRCMV-H1BDVc) or the BDV
178 antigenome with desired insertions, together with 0.05 µg of pCA-N, 0.1 µg of pCA-L
179 and 0.05 µg of pCA-P. Three days after transfection, cells were trypsinized and

180 seeded onto T75 flasks together with 10^6 Vero cells. The co-cultures were kept in
181 DMEM supplemented with 4 % FCS and were split twice per week. Rescue rate was
182 determined by staining against BDV-N every week as described (24). When the
183 infection of Vero cells reached 80 % or more, a first virus stock was made. To avoid
184 contamination with input plasmids, the first virus stock was used to infect Vero cells
185 and a second virus stock was made when the infection rate reached 100 %. The
186 second virus stock was then used for further experiments.

187

188 **Preparation of BDV virus stocks.** BDV was isolated from persistently infected Vero
189 cells as described previously (24). Briefly, confluent cells grown in 94-mm dishes
190 were rinsed with 5 ml of 20 mM HEPES, pH 7.4 and incubated for 2 h at 37 °C in a 5
191 % CO₂-humidified atmosphere with 10 ml of 20 mM HEPES, pH 7.4, 250 mM MgCl₂
192 and 1 % FCS. Cell supernatant was centrifuged twice at 2.500 x rpm for 5 min to
193 remove cell debris, followed by ultra-centrifugation above a 20 % sucrose cushion at
194 24.000 x rpm at 8 °C for 1 h. Viral pellets were re-suspended in 400 µl of phosphate
195 buffered saline (PBS) without Ca²⁺ and Mg²⁺. Virus stock was then dialyzed in PBS
196 without Ca²⁺ and Mg²⁺ before usage. Viral titers were determined on Vero cells as
197 described (24).

198

199 **Viral growth curves.** Vero cells (10^5 cells/well in a 24-well dish) were infected with
200 rBDV-Pwt, rBDV-P-Flag and rBDV-P-Flag-TCT with an MOI of 0.01. Three days
201 later, infected cells were trypsinized and seeded into 6-well plates. The cell cultures
202 were split twice per week and at each passage, the rate of infected cells was
203 monitored by immunofluorescence analysis using a polyclonal BDV-N specific

204 antibody. Viral growth kinetics was repeated 3 times independently.

205

206 **Western blot analysis.** rBDV-infected and uninfected Vero cells grown in 35-mm
207 dishes were harvested in 200 µl of Laemmli buffer, followed by ultrasonication.
208 Protein extracts were size-fractionated with 13 % sodium dodecyl sulfate
209 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) and blotted onto PVDF membranes.
210 Membranes were blocked in blocking solution and incubated with primary antibodies
211 (mouse anti-β tubulin, 1:1000, Sigma, mouse anti-Flag M2, 1:200, Sigma F3165;
212 rabbit polyclonal anti-BDV-N, 1:1000 and rabbit polyclonal anti BDV-P, 1:1000) for 1
213 h at room temperature. After being washed with PBS-0.1 % Tween-20, the
214 membrane was incubated with secondary antibodies (Alkaline phosphatase
215 conjugated goat anti-rabbit IgG 1:2000, Jackson ImmunoResearch; Alkaline
216 phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG 1:2000, Jackson ImmunoResearch) for
217 1 h at room temperature. The membrane was washed in PBS with 0.1 % Tween-20
218 and incubated with Tris-Tween buffered saline and citric acid buffer (15 min each).
219 Finally, protein levels were visualized with the developing solution containing 5 mM
220 MgCl₂, 5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt (BCIP, Carl Roth GmbH)
221 and Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) in CBS.

222

223 **RNA preparation and Northern blot analysis.** Total RNA was prepared from BDV-
224 infected or uninfected Vero cells in 35-mm dishes with peqGOLD TriFast reagent
225 (PeqLab). For Northern blot analysis, 5 µg of total RNA from each sample was size-
226 fractionated on a 1.2 % agarose gel containing 3.7 % formaldehyde and blotted
227 overnight onto a nylon membrane. The RNA was cross-linked to the membrane by

228 baking at 80 °C for 2 h. For pre-hybridization, the membrane was first treated in 0.2 X
229 SSC/0.5 % SDS at 68 °C for 10 min, followed by 2-3 h at 42 °C in hybridization buffer
230 (5 X PIPES, 1 X Denhardt's buffer, 50 % formamide, 0.2 % SDS and 200 µg/ml ss
231 Herring sperm DNA) under continuous rotation. DNA probes against BDV-N/P/X,
232 (nucleotides 976 to 1749) were prepared by PCR and the PCR products were
233 radiolabeled with ³²P according to manufacturer's protocol (DecaLabel DNA Labeling
234 kit, Fermentas). After prehybridization, radiolabeled DNA probes were added into the
235 hybridization buffer and the membrane was incubated overnight at 42 °C. The blot
236 was rinsed once with 2 X SSC/0.5 % SDS at room temperature. The blot was then
237 washed again with 2 X SSC/0.5 % SDS at 65 °C and exposed at -80 °C to a Biomax
238 MR film (Kodak).

239

240 **Immunoprecipitation.** 10⁷ cells grown in 100-mm dishes were harvested in 500 µl of
241 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0.5 % sodium
242 deoxycholate, 0.1 % SDS and a tablet of protease inhibitor cocktail (Complete,
243 Roche). 200 µl of lysate was incubated with 0.5 µl of rabbit polyclonal anti BDV-P
244 antibody and 30 µl of protein G plus agarose beads (Santa Cruz Biotechnology),
245 overnight at 4 °C. Immunoprecipitates were centrifuged, pellets were washed three
246 times in the same buffer and resuspended in Laemmli electrophoresis loading buffer.
247 Total extracts and immunoprecipitated fractions were then subjected to western blot
248 analysis using anti BDV-N or BDV-P antibodies.

249

250 **Plasmid transfections.** Vero cells lines were seeded in 12-well plates and grown to
251 80 % were transfected with Fugene 6 (Roche) according to the manufacturer's

252 recommendations. Cells were used 48-72 h after transfection.

253

254 **FIAsh labeling and live-cell imaging.** Cells were seeded in Lab-Tek chambers 8 h
255 before labeling and imaging. Cells were washed once with PBS and once with
256 OptiMEM prior to FIAsh labeling (Life Technologies). The protocol recommended by
257 the manufacturer was followed precisely and in another set of experiments, FIAsh
258 labeling was optimized as described below. In this case, FIAsh reagent was diluted
259 in OptiMEM (2.5 μ M final concentration), added to cells and incubated for 15 min at
260 RT in the dark. Cells were rapidly rinsed twice with OptiMEM, then once in 5 X BAL
261 buffer (2,3-dimercapto-1-propanol) diluted in OptiMEM for 10 minutes and finally
262 once in 1 X BAL buffer for 10 minutes. All washes were performed in the dark at RT.
263 Cells were left in 1 X BAL buffer for imaging. For real time imaging, cells were
264 maintained at 37 °C under 5 % of CO₂ in an enclosed chamber and were observed
265 with a confocal microscope (Carl Zeiss LSM 710 equipped with a 63 X objective NA:
266 1.4, laser power set at 0.4 %). Images were acquired in z stacks every 4 min. Images
267 were processed with Zen software (Carl Zeiss).

268

269 **Combined FIAsh labeling and immunofluorescence staining.** Cells seeded in
270 Lab-Tek chambers were first labeled with FIAsh as described above. Cells were then
271 fixed with 4 % paraformaldehyde/PBS for 20 min, permeabilized with 0.1 % Triton X-
272 100/PBS for 4 min, blocked in 5 % normal goat serum (NGS) and incubated with anti
273 BDV-P or -N antibodies (each diluted 1:1,000 in PBS-NGS) for 1 h at room
274 temperature, followed by incubation with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit
275 IgG (Life technologies). Images were acquired using a confocal microscope (Carl

276 Zeiss LSM 710).

277

278 **Fluorescence Recovery after Photo-bleaching (FRAP).** Cells were visualized with
279 a LSM 710 confocal microscope equipped with a heating chamber, using the 488 nm
280 laser line and a 490-590 nm emission filter. Disk photo-bleaching was performed
281 using circular regions of interest (ROI) of 1.5 μm in diameter (ω), placed either on the
282 cytoplasm or on the viral nuclear dots (vSPOTs). Region was photo-bleached with
283 the 488 nm laser line to obtain 35–80 % photo-bleaching compared to the pre-bleach
284 image. The pinhole was kept fully open to ensure maximum photon collection during
285 recovery. Unbleached control cells were monitored in parallel for photo-bleaching
286 due to image acquisition after background subtraction. Data were collected every
287 0.23 s for an average of 1 min. All measurements were carried out at 37 °C and 5 %
288 CO₂. Correction for photo-bleaching due to acquisition was done for each time point
289 after background correction. For each condition, FRAP recovery curves were
290 averaged using Excel software and fluorescence intensities were normalized by
291 setting the initial fluorescence to a value of 1. Recovery curves were calculated using
292 a non-linear least squares fit equation as described by Soumpasis et al. (25), which
293 was implemented in an Excel spreadsheet. This formula is adapted for the analysis
294 of fluorescence recovery curves measured in fluorescence photo-bleaching recovery
295 experiments employing uniform circular laser beams, as done here. The
296 characteristic diffusion time TD was obtained from the fitted curve:

297
$$F(t) = (F_{\infty} - F_0) [e^{(-2TD/t)} \{ I_0(2TD/t, 0) + I_1(2TD/t, 1) \}] + F_0,$$

298 where I_0 and I_1 are modified Bessel functions, D is the diffusion coefficient, t is the
299 time in seconds, F_{∞} is the fluorescence intensity after full recovery, F_0 is the

300 fluorescence intensity immediately after photo-bleaching. Data fitting was performed
301 using the Excel solver tool with two iterations, which calculates for each time point
302 the square of the difference between the theoretical model and the observed
303 fluorescence (Chi^2). The diffusion coefficient D was calculated with the following
304 formula:

$$305 \quad D = \omega^2 / (4TD),$$

306 with ω being the radius of the ROI set and TD obtained from the fit of the recovery
307 curve. The fit also yielded the viral mobile fraction M , with the formula:

$$308 \quad M = (F_{\infty} - F_{\text{pre-bleach}} / F_0 - F_{\text{post-bleach}}).$$

309 Results are reported as experimental and fitting FRAP curves, associated with
310 residuals values calculated for each time point (Chi^2).

311

312 **Two-Photon Excitation microscopy (TPEM) fluorescence loss in photo-**
313 **bleaching (FLIP).** For TPEM FLIP experiments in nuclear vSPOTs, a single spot
314 with a diameter of 2 μm within the nucleus was repeatedly photo-bleached with a 940
315 nm femtosecond Chameleon Ultra II (Coherent S.A.) laser line (iterations at 26 %
316 power), using a Carl Zeiss LSM 7MP with a 40 X PlanApo lens (NA 1.3). The
317 measured diameter of a single z-axis plane was 950 nm. Two images were collected
318 after each bleach pulse, with 2.26 s between bleach pulses. After collecting 300
319 images, two separate measurements on the viral nuclear dots were taken to analyze
320 fluorescence loss. Unbleached control cells were monitored for photo-bleaching due
321 to image acquisition after background subtraction. The rate of loss in fluorescence on
322 the neighbor viral nuclear point was calculated from fluorescence intensity
323 measurements after a background subtraction using the Carl Zeiss Zen software.

324 The fluorescence intensities were normalized by setting the initial fluorescence to
325 100 %. Plots were drawn for normalized fluorescence over time.

326

327 **Confocal microscopy FLIP.** A single spot with a diameter of 2 μm within the
328 cytoplasm was repeatedly photo-bleached with a 488 nm laser line (iterations at 100
329 % power), using a Carl Zeiss LSM 710 with a 63 X PlanApo lens (NA 1.4). The
330 measured diameter of a single z-axis plane was 400 nm. Two images were collected
331 after each bleach pulse, with 3.2 s between bleach pulses. After collecting 200
332 images, two separate measurements on the cytoplasmic regions were taken to
333 analyze the fluorescence loss. Unbleached control cells were monitored for photo-
334 bleaching due to image acquisition after a background subtraction. The rate of loss in
335 fluorescence on the neighbor cytoplasmic region or the nuclear viral spot was
336 calculated from fluorescence intensity measurements after a background subtraction
337 using Zen software (Carl Zeiss). Fluorescence intensities were normalized by setting
338 the initial fluorescence to 100 %. Plots were drawn for normalized fluorescence over
339 time.

RESULTS

340

341

342 **Generation and characterization of tagged BDV.** In order to visualize BDV traffic
343 in cells using live imaging, we first generated BDV rescue plasmids encoding GFP
344 tagged BDV-N, -P or -L proteins (Fig. 1A). However, we failed to rescue these
345 viruses, suggesting that fusion to GFP is not tolerated in any case. Next, we tried to
346 rescue recombinant BDV (Fig. 1A), encoding either BDV-N, -P or -L fused to a
347 tetracysteine tag (TCT). Again, rescue of these recombinant viruses (BDV-N-TCT,
348 BDV-P-TCT or BDV-L-TCT) failed. To test whether any tag could be fused to BDV
349 proteins in the context of an infectious clone, we then tried to rescue BDV harboring
350 a Flag-tag at the N-terminus of BDV-N or at the C-termini of either BDV-P or -L (Fig.
351 1A). Although BDV coding for Flag-tagged BDV-N or BDV-L could not be generated,
352 we successfully rescued a virus expressing Flag-tagged BDV-P protein, designated
353 rBDV-P-Flag. Encouraged by these findings, we generated and successfully rescued
354 a virus harboring a TCT in addition to the C-terminal Flag tag of BDV-P, designated
355 rBDV-P-Flag-TCT (Fig. 1A). Sequencing of both rBDV-Flag and rBDV-Flag-TCT
356 viruses revealed no compensatory mutations in the BDV-P ORF (data not shown).

357 To study the growth properties of these recombinant BDV, we infected Vero cells
358 with rBDV-Pwt, rBDV-P-Flag and rBDV-P-Flag-TCT at an MOI of 0.01 and monitored
359 viral spread by staining for BDV-N. In contrast to rBDV-Pwt, the infection rates of
360 Vero cells were delayed with both rBDV-P-Flag and rBDV-P-Flag-TCT (Fig.1B). After
361 an initial delay in the early steps of infection, all recombinant viruses however
362 achieved 100% infection and established persistence.

363 Next, we determined steady-state levels of viral transcripts in persistently infected

364 Vero cells by Northern blot analysis, using a DNA probe comprising nucleotides 976
365 to 1749 (BDV-N/P/X). As shown in Fig. 1C, levels of the 0.8kb and 1.2kb transcripts
366 were comparable between cells infected with recombinant wild type and mutant
367 viruses. Compared to wild type-infected cells, we observed in the mutant virus-
368 infected cells a decrease in 1.9 kb transcripts accompanied by an increase of 4.7 kb
369 transcripts. The accumulation of the latter transcripts is most likely due to a read-
370 through at the transcription termination site T1 and T2 (26). However, Western blot
371 analysis revealed comparable levels of BDV-N and -P in rBDV-Pwt, rBDV-P-Flag and
372 rBDV-P-Flag-TCT persistently infected Vero cells (Fig. 1D). In addition, co-
373 immunoprecipitation experiments showed that BDV-P protein dually tagged with Flag
374 and TCT was still able to interact with BDV-N and hence to presumably be
375 incorporated in RNP (Fig. 2). Thus, despite the difficulties to rescue recombinant
376 BDV bearing a component of the RNP fused to a fluorescent tag, we were able to
377 recover a recombinant virus with a TC-tagged BDV-P.

378

379 **Characterization of FIAsH-labeled cells.** The TCT added to BDV-P forms a
380 putative hairpin that strongly and specifically reacts with the FIAsH biarsenical
381 reagents to covalently label the protein of interest. When applied to persistently
382 infected cells using the staining conditions suggested by the manufacturer, we
383 observed that FIAsH labeling yielded non-specific cytoplasmic punctate background
384 (i.e., also observed in non-infected cells) (Fig. 3A). Although staining appeared
385 clearly different in infected cells, the unspecific background under these staining
386 conditions was unacceptable for further subcellular localization studies. We thus
387 sought to optimize FIAsH labeling (see Methods), in particular by increasing the

388 stringency of washes after staining. This procedure led to much better labeling
389 conditions that revealed a specific staining only in rBDV-P-Flag-TCT infected cells
390 (Fig. 3A). Staining was reminiscent of that classically observed in BDV-infected cells
391 and was characterized by a diffuse cytoplasmic pattern and a punctate staining in the
392 nucleus (Fig. 3A). To demonstrate that FIAsH-labeled protein reflected the authentic
393 BDV-P protein in BDV-infected cells, we performed a combination of FIAsH labeling
394 and immunofluorescence analysis for BDV-P. As shown in Fig. 3B, antibody staining
395 for BDV-P and FIAsH labeling largely overlapped (Mander's correlation coefficient:
396 0.79 ± 0.11 , $n=10$) (27), confirming that FIAsH labeling of the TC-tag can truly detect
397 BDV-P protein in infected cells. FIAsH labeling was also largely super-imposable with
398 immunofluorescence staining for BDV-N (Fig. 3C), suggesting that labeling of this
399 TC-tag allows detecting BDV RNP complexes, although we cannot exclude the
400 possibility that part of the staining could be due to soluble or complexes of BDV-P not
401 associated to RNP.

402

403 **Visualization of BDV-P kinetics in infected cells.** Having shown that FIAsH
404 labeling of TC-tagged BDV-P protein allowed studying the behavior of BDV in live
405 infected cells, we analyzed BDV kinetics by confocal microscopy, upon FIAsH
406 labeling of Vero cells persistently infected with rBDV-P-Flag-TCT. In the nucleus of
407 infected cells, the punctate staining appeared extremely static and we did not detect
408 any change in their number or distribution throughout the observation period (up to
409 12 hours, Fig. 4A, movie S1 and data not shown). The labeling characteristics were
410 strikingly different in the cytoplasm of infected cells, with very dynamic movements of
411 viral material, which was even sometimes exchanged between adjacent cells (Fig. 4A

412 and movie S1).

413 Recently, Matsumoto et al. demonstrated that the viral inclusions revealed by the
414 punctate nuclear staining for BDV, designated vSPOTs (viral speckles of transcripts),
415 represent viral factories using the cellular chromatin as a scaffold (17). Since viral
416 factories are sites of ongoing viral replication, this finding implies that the dynamics of
417 viral components in vSPOTs should include active exchanges with other viral
418 components such as BDV-P. However, this appears at first sight in contradiction with
419 our real-time imaging findings, which revealed that vSPOTs were very stable,
420 although rather slow exchange processes might not be easily visualized by real-time
421 imaging. To analyze further the relative nuclear and cytoplasmic mobility of BDV-P,
422 we used Fluorescence Recovery after Photo-bleaching (FRAP) to photo-bleach a
423 circular defined region of the nucleus or the cytoplasm and the time taken to refill the
424 photo-bleached area was measured. When applied to a nuclear vSPOT (Fig. 4B),
425 this analysis revealed a progressive, but incomplete recovery of the photo-bleached
426 area, contrasting with the very rapid and complete recovery when FRAP was applied
427 to a cytoplasmic area (Fig. 4C). To compare the relative mobility of viral material, we
428 analyzed the fluorescence recovery curves in both cases. Since we used a uniform
429 disk photo-bleaching for FRAP experiments and because of the extension of the
430 photo-bleaching in the z-axis due to confocal, diffusion along the z-axis can be
431 neglected. We thus used a 2D fitting model to analyze the fluorescence recovery
432 curves (25). We first calculated the mobile fraction (M), obtained as a result of the
433 curve fit, and which is defined as the maximum fractional recovery of the fluorescent
434 protein in the region of interest. In vSPOTs, the mobile fraction accounted for 86 %
435 (i.e., showing that 14 % of BDV-P is immobile within vSPOTs, the rest being mobile),
436 contrasting with the 100 % rate of mobile fraction in the cytoplasm (Fig. 4B and 4C,

437 center panels). We also measured the diffusion coefficient values (D), representing
438 the rate at which a protein repopulates a photo-bleached area (Fig. 4B and 4C,
439 center panels). These measures confirmed that BDV-P had a lower mobility in
440 vSPOTs ($D = 0.190\mu\text{m}^2/\text{s}$, Fig. 4B). Importantly, the D value for BDV-P in vSPOTs is
441 comparable to those previously reported for nucleosomal-binding proteins, such as
442 HMG-17 (28). Moreover, this value is much lower than values reported for free
443 solutes in the nucleus (29), suggesting that it is due to interaction with nuclear
444 components. In contrast, D value obtained for the cytoplasm ($D = 1.335\mu\text{m}^2/\text{s}$, Fig.
445 4C) confirmed the virtual absence of immobile molecules. Taken together, these
446 findings suggest that a fraction of BDV-P in the nucleus is associated or interacts
447 with nuclear proteins, thereby resulting in significant immobility.

448 To determine the relative trafficking of BDV-P between different vSPOTs or between
449 the different cellular compartments, we used a Fluorescence Loss Induced by Photo-
450 bleaching (FLIP) approach, in which a defined area is continuously photo-bleached
451 using high laser power. The loss of fluorescence in a defined area outside of the
452 bleached region is measured over time and provides information on the rate of
453 dissociation of the protein from this particular compartment. To perform FLIP on
454 vSPOTs, we wanted to ensure that continuous photo-bleaching that characterizes
455 this technique would be restricted to this focal area in the nucleus. To this end, we
456 developed a 2-photon-based procedure, in which photo-bleaching is indeed restricted
457 to this nuclear area, due to the confined excitation at the focal plane (Fig. 5A). By
458 repeatedly photo-bleaching a vSPOT area, more than 60 % fluorescence was lost
459 from a neighboring vSPOT (Fig. 5B), showing that BDV-P is continuously exchanged
460 between vSPOTs. Moreover, FLIP revealed that continuous photo-bleaching of the
461 nucleoplasm (Fig. 5C) led to a fast decay of fluorescence in a neighboring vSPOT,

462 suggesting that BDV-P continuously dissociates from this compartment and that its
463 movements are not restricted to any particular nuclear domain. Finally, we also
464 applied confocal-based FLIP to a defined area of the cytoplasm and monitored
465 trafficking in three regions: another area of the cytoplasm, the nucleoplasm and a
466 vSPOT (Fig. 5D). This analysis revealed a rapid trafficking of BDV-P in the
467 cytoplasm, but also trafficking between the cytoplasm and the nucleus. The
468 trafficking between these two compartments was however much slower, in particular
469 for vSPOTs, consistent with the low diffusion coefficient value of BDV-P in this area
470 as determined by FRAP analyses.

471 Thus, despite an apparent static behavior of BDV-P as initially suggested by real-
472 time imaging, our FRAP and FLIP data indicate a permanent trafficking of this protein
473 between the different cellular compartments, albeit with a lower mobility of a fraction
474 of BDV-P in vSPOTs, presumably resulting from its association with viral and/or
475 cellular proteins.

476

477 **Analysis of BDV cell-to-cell transfer.** In order to test whether rBDV-P-Flag-TCT
478 would allow imaging BDV transfer between cells, we analyzed FIAsh-labeled infected
479 Vero cells for longer periods using a temperature-controlled confocal microscope
480 setting. Since we had observed very dynamic movements of fluorescent material in
481 the cytoplasm of persistently infected Vero cells (see Fig. 4A), we first sought to
482 investigate this finding further. We observed that viral transfer between adjacent
483 infected cells actually occurred, preferentially through cytoplasmic projections
484 connecting two cells. The transferred viral material was thereafter progressively
485 routed towards the nucleus of the target cells (Fig 6A-C, movie S2). Interestingly,

486 viral transfer was still observed in cells treated with cytochalasin D, despite efficient
487 disruption of the actin network, suggesting that cell-to-cell BDV transfer is not
488 absolutely dependent on cytoskeleton rearrangements (Fig. 7).

489 We then sought to analyze the early steps of BDV infection. The low yield of cell-free
490 viral particles that characterizes BDV infection (30) was very limiting for performing
491 this analysis with FIASH-labeled, cell-free virus. Rather, we transiently transfected
492 non-infected Vero cells with a mRFP-Cherry expressing plasmid and cocultivated
493 these cells with FIASH-labeled infected Vero cells. Viral transfer between infected
494 and non-infected cells was evidenced by the appearance of green fluorescent
495 material in the red cells. Real-time imaging revealed that viral transfer first occurred
496 at the contact with the infected cells and was followed by a progressive movement of
497 viral complexes towards the nuclear area (Fig. 6D-F, movie S3).

DISCUSSION

498

499

500 In this work, we have sought to generate infectious rBDV bearing a fluorescent tag
501 fused to one of the components of the RNP. We succeeded in generating a
502 recombinant virus bearing a TC-tag on the BDV-P protein, which was stable and
503 readily established a persistent infection of susceptible cells, albeit with a delayed
504 infection rate compared to recombinant wild-type virus. Upon optimized biarsenical
505 labeling, we were able to perform real-time fluorescence imaging of BDV-P kinetics in
506 living cells. Notably, we measured the kinetics of BDV-P in the nucleus and
507 cytoplasm of infected cells using photo-bleaching techniques (FRAP and FLIP),
508 including a new 2-photon based FLIP approach suited to image BDV-P dynamics in
509 viral nuclear inclusions (vSPOTs). The novelty of our study lies on the first
510 description of BDV dynamics in the context of virus infection and on the visualization
511 of BDV trafficking in live, infected cells.

512

513 Initially, we wished to generate a recombinant BDV bearing a GFP fused in frame
514 with either BDV-N -P or -L proteins, but none of these recombinant viruses could be
515 rescued, presumably due to the compact nature of the BDV genome and its complex
516 transcription map. Even adding a smaller tag such as TCT, which supposedly can be
517 fused to the protein of interest with minimal disruption of protein function, proved to
518 be intrinsically difficult for BDV. Indeed, insertion of TCT yielded an infectious
519 recombinant virus only when it was inserted together with a Flag tag. The reason for
520 this is unclear and may be the result of a spacer function of the Flag tag.
521 Alternatively, the addition of the highly charged and hydrophilic Flag tag may have

522 compensated the charge of the tetracysteine tag, thereby leading a successful
523 rescue. The recent description of a new recombinant BDV bearing an additional
524 transcription cassette in the intercistronic noncoding region between BDV-P and -M
525 genes (23) may provide new leads to insert fluorescent fusion proteins, since this
526 vector appears to be more stable than the previously reported backbones used for
527 BDV rescue.

528

529 Although FIAsH/TCT-based labeling of recombinant viruses has proven its
530 considerable interest to track viral entry and trafficking, it often requires that the TC-
531 tagged virus is grown at high titers and purified after labeling prior to analysis (21).
532 The paucity of cell-free virus associated with BDV infection and the inability to grow
533 cell-free infectious BDV to high titers does not allow adopting such a strategy. Thus,
534 FIAsH labeling and imaging of TCT-tagged BDV needs to be performed on
535 persistently infected cells. In this case, the intracellular background staining due to
536 binding of the FIAsH reagent to off-target cysteine-rich proteins represents a
537 considerable issue, as revealed by our initial attempts using the labeling conditions
538 recommended in the commercial kit. This issue has also been encountered by
539 others, for example when trying to label amyloid precursor or prion proteins, or to
540 track HCV core or HIV gag proteins, and these groups have developed modified and
541 optimized staining conditions or new imaging techniques to circumvent this problem
542 (31-33). To achieve a satisfying signal-to-noise ratio, we also developed our own
543 optimized FIAsH labeling protocol that satisfactorily allowed live BDV imaging in
544 persistently infected Vero cells. To date, it remains however to be determined
545 whether such optimized staining conditions will also be applicable to any type of

546 cells, or to other infection models. Alternatively, it may be interesting in the future to
547 test other approaches to generate fluorescent BDV. One attractive alternative may be
548 the split-GFP technology, as elegantly described recently for influenza virus and its
549 co-transportation with the cellular protein Rab11 (34).

550

551 We were particularly interested in obtaining further insight on the dynamics of BDV
552 components in the nuclear vSPOTs, because it was recently shown that they
553 represent viral nuclear factories associated with the host cell chromatin (17). FRAP
554 analysis revealed that BDV-P is mobile but that part of this protein remains tightly
555 associated with vSPOTs. Interestingly, the diffusion coefficient measured for BDV-P
556 was in the same range than those reported for nucleosomal-binding proteins (28).
557 This finding is consistent with previous results showing that BDV interacts with high
558 mobility group box protein 1 (HMGB-1), a non-histone DNA architectural protein (17,
559 35, 36) and further suggests that shuttling of BDV RNP involves dynamic interaction
560 with this cellular protein and/or perhaps with other cellular factors yet to be identified.
561 Moreover, FLIP analysis demonstrated that a permanent shuttling of BDV-P between
562 vSPOTs occurs, as well as with the other cellular compartments.

563

564 Long-term live imaging of persistently infected cells revealed very dynamic
565 movements of viral material occurring at cell contacts. Surprisingly, we observed that
566 viral components, presumably RNP, could be exchanged between cells and video
567 capture of these events suggested that viral exchange might result from microfusion
568 events occurring at contact sites between cells. The determinants of these events,
569 notably the potential contribution of BDV surface glycoprotein (G), remains to be fully

570 deciphered and could be addressed using BDV-G neutralizing antibodies (37). Even
571 more surprising was the fact that the transferred material was routed towards the
572 nucleus of the neighboring cell, because it was shown previously that BDV infected
573 cells are resistant to superinfection (38, 39). It is likely, however, that infection will not
574 proceed further because of unbalanced intracellular levels of viral nucleocapsid
575 components.

576

577 It has long been postulated that BDV could spread in the form of bare RNP (40, 41).
578 In agreement with this hypothesis, our coculture experiments using infected and non-
579 infected cells revealed a sizeable cell-to-cell transfer of viral material, although it
580 remains to be shown whether this material represents viral RNPs. This process was
581 however not seen in all non-infected neighboring cells. At present, it is difficult to
582 assess whether the relative inefficiency of this cell-to-cell BDV transfer actually
583 reflects the situation of natural infection or if it is due to the particular phenotype of
584 our recombinant virus. In any event, and similar to what was observed in persistently
585 infected cells, this viral material was thereafter routed towards the nucleus, which is
586 in agreement with a nuclear localization of BDV replication and transcription. Thus,
587 this recombinant virus clearly allows the visualization of BDV cell-to-cell transfer and
588 its progressive transport to the nucleus. Recently, a siRNA-based functional genetic
589 screen allowed the identification of host cell factors involved in BDV entry (42). It may
590 be interesting in the future to probe the identified target genes by live imaging using
591 our TC-tagged virus. This will allow assessing whether such genes play a role in cell-
592 to-cell transfer, intracellular or even intranuclear dynamics of BDV RNP. In
593 conclusion, our fluorescent BDV allowed to image some characteristics of BDV life

594 cycle and has provided the first description of BDV dynamics in persistently infected
595 cells. We are currently examining whether this TC-tagged virus could be used to
596 track BDV infection in neurons, the main target for BDV in the CNS.

597 **ACKNOWLEDGEMENTS**

598 This work was supported financially by grants from INSERM, the ANR (Agence
599 Nationale de la Recherche, Project ANR-10-Blanc-1322), the Fondation Recherche
600 Médicale ("Equipe FRM 2009") to DGD, the CNRS (to DGD) and the DFG (To MS).
601 C.M.C. was the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of
602 Research. Y-J.W. was supported by the Spemann Graduate School of Biology and
603 Medicine, University of Freiburg, Germany.

604 We thank M. Fallet (CIML imaging facility, Marseille, France) for assistance in
605 analysis of fluorescence recovery curves; D. Sapède (Carl Zeiss SAS, France) for
606 expert assistance during the initial steps of imaging studies; M. Szelechowski, R.
607 Liblau and A. Saoudi for critical reading of the manuscript.

608

609

- 612 1. **de la Torre JC.** 1994. Molecular biology of Borna disease virus: prototype of a
613 new group of animal viruses. *J. Virol.* **68**:7669-7675.
- 614 2. **Schneemann A, Schneider PA, Lamb RA, Lipkin WI.** 1995. The remarkable
615 coding strategy of Borna disease virus: a new member of the nonsegmented
616 negative strand RNA viruses. *Virology* **210**:1-8.
- 617 3. **Briese T, Schneemann A, Lewis AJ, Park YS, Kim S, Ludwig H, Lipkin WI.**
618 1994. Genomic organization of Borna disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
619 *USA* **91**:4362-4366.
- 620 4. **Cubitt B, Oldstone C, Valcarcel J, de la Torre JC.** 1994. RNA splicing
621 contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-
622 segmented negative strand RNA virus. *Virus Res.* **34**:69-79.
- 623 5. **Schneider PA, Schneemann A, Lipkin WI.** 1994. RNA splicing in Borna
624 disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* **68**:5007-
625 5012.
- 626 6. **Poenisch M, Burger N, Staeheli P, Bauer G, Schneider U.** 2009. Protein X
627 of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the
628 central nervous systems of newborn-infected rats. *J. Virol.* **83**:4297-4307.
- 629 7. **Wensman JJ, Munir M, Thaduri S, Hornaeus K, Rizwan M, Blomstrom AL,**
630 **Briese T, Lipkin WI, Berg M.** 2013. The X proteins of Bornaviruses interfere
631 with type I interferon signalling. *J. Gen. Virol.* **94**:263-269.
- 632 8. **Ludwig H, Bode L.** 2000. Borna disease virus: new aspects on infection,
633 disease, diagnosis and epidemiology. *Rev. Sci. Tech.* **19**:259-288.
- 634 9. **Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, Ehrensperger F, Schwemmler M.** 2000.
635 Epidemiology of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* **81**:2123-2135.
- 636 10. **Honkavuori KS, Shivaprasad HL, Williams BL, Quan PL, Hornig M, Street**
637 **C, Palacios G, Hutchison SK, Franca M, Egholm M, Briese T, Lipkin WI.**
638 2008. Novel Borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation
639 disease. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:1883-1886.
- 640 11. **Kistler AL, Gancz A, Clubb S, Skewes-Cox P, Fischer K, Sorber K, Chiu**
641 **CY, Lublin A, Mechani S, Farnoushi Y, Greninger A, Wen CC, Karlene SB,**
642 **Ganem D, DeRisi JL.** 2008. Recovery of divergent avian Bornaviruses from
643 cases of proventricular dilatation disease: Identification of a candidate etiologic
644 agent. *Virology J.* **5**.
- 645 12. **Pletnikov M, Gonzalez-Dunia D, Stitz L.** 2002. Experimental infection:
646 pathogenesis of neurobehavioral disease, p. 125-178. *In* Carbone K (ed.),
647 Borna disease virus and its role in neurobehavioral disease. ASM press,
648 Washington D.C.
- 649 13. **Gonzalez-Dunia D, Volmer R, Mayer D, Schwemmler M.** 2005. Borna
650 disease virus interference with neuronal plasticity. *Virus Res.* **111**:224-234.
- 651 14. **Clemente R, de la Torre JC.** 2009. Cell entry of Borna disease virus follows a
652 clathrin-mediated endocytosis pathway that requires Rab5 and microtubules.
653 *J. Virol.* **83**:10406-10416.
- 654 15. **Gonzalez-Dunia D, Cubitt B, de la Torre JC.** 1998. Mechanism of Borna
655 disease virus entry into cells. *J. Virol.* **72**:783-788.

- 656 16. **Gonzalez-Dunia D, Cubitt B, Grässer FA, de la Torre JC.** 1997.
657 Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein
658 involved in virus entry. *J. Virol.* **71**:3208-3218.
- 659 17. **Matsumoto Y, Hayashi Y, Omori H, Honda T, Daito T, Horie M, Ikuta K,**
660 **Fujino K, Nakamura S, Schneider U, Chase G, Yoshimori T, Schwemmle**
661 **M, Tomonaga K.** 2012. Bornavirus closely associates and segregates with
662 host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host &*
663 *Microbe* **11**:492-503.
- 664 18. **Finke S, Brzozka K, Conzelmann KK.** 2004. Tracking fluorescence-labeled
665 rabies virus: enhanced green fluorescent protein-tagged phosphoprotein P
666 supports virus gene expression and formation of infectious particles. *J. Virol.*
667 **78**:12333-12343.
- 668 19. **Das SC, Nayak D, Zhou Y, Pattnaik AK.** 2006. Visualization of intracellular
669 transport of vesicular stomatitis virus nucleocapsids in living cells. *J. Virol.*
670 **80**:6368-6377.
- 671 20. **Griffin BA, Adams SR, Tsien RY.** 1998. Specific covalent labeling of
672 recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**:269-272.
- 673 21. **Whitt MA, Mire CE.** 2011. Utilization of fluorescently-labeled tetracysteine-
674 tagged proteins to study virus entry by live cell microscopy. *Methods* **55**:127-
675 136.
- 676 22. **Ackermann A, Guelzow T, Staeheli P, Schneider U, Heimrich B.** 2010.
677 Visualizing viral dissemination in the mouse nervous system, using a green
678 fluorescent protein-expressing Borna disease virus vector. *J. Virol.* **84**:5438-
679 5442.
- 680 23. **Daito T, Fujino K, Honda T, Matsumoto Y, Watanabe Y, Tomonaga K.**
681 2011. A novel Borna disease virus vector system that stably expresses foreign
682 proteins from an intercistronic noncoding region. *J. Virol.* **85**:12170-12178.
- 683 24. **Schneider U, Schwemmle M, Staeheli P.** 2005. Genome trimming: a unique
684 strategy for replication control employed by Borna disease virus. *Proc. Natl.*
685 *Acad. Sci. U S A* **102**:3441-3446.
- 686 25. **Soumpassis DM.** 1983. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching
687 recovery experiments. *Biophys. J.* **41**:95-97.
- 688 26. **Schneider U.** 2005. Novel insights into the regulation of the viral polymerase
689 complex of neurotropic Borna disease virus. *Virus Res.* **111**:148-160.
- 690 27. **Manders EM, Stap J, Brakenhoff GJ, van Driel R, Aten JA.** 1992. Dynamics
691 of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by
692 double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* **103**:857-862.
- 693 28. **Phair RD, Misteli T.** 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell
694 nucleus. *Nature* **404**:604-609.
- 695 29. **Seksek O, Biwersi J, Verkman AS.** 1997. Translational diffusion of
696 macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *J. Cell Biol.* **138**:131-
697 142.
- 698 30. **Carbone KM, Rubin SA, Sierra-Honigmann AM, Lederman HM.** 1993.
699 Characterization of a glial cell line persistently infected with Borna disease
700 virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA
701 expression. *J. Virol.* **67**:1453-1460.
- 702 31. **Taguchi Y, Shi ZD, Ruddy B, Dorward DW, Greene L, Baron GS.** 2009.
703 Specific biarsenical labeling of cell surface proteins allows fluorescent- and
704 biotin-tagging of amyloid precursor protein and prion proteins. *Mol. Biol. Cell*

- 705 20:233-244.
- 706 32. **Rudner L, Nydegger S, Coren LV, Nagashima K, Thali M, Ott DE.** 2005.
707 Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in
708 live cells by biarsenical labeling. *J. Virol.* **79**:4055-4065.
- 709 33. **Counihan NA, Rawlinson SM, Lindenbach BD.** 2011. Trafficking of hepatitis
710 C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Path.* **7**:e1002302.
- 711 34. **Avilov SV, Moisy D, Naffakh N, Cusack S.** 2012. Influenza A virus progeny
712 vRNP trafficking in live infected cells studied with the virus-encoded
713 fluorescently tagged PB2 protein. *Vaccine* **30**:7411-7417.
- 714 35. **Kamitani W, Shoya Y, Kobayashi T, Watanabe M, Lee BJ, Zhang G,
715 Tomonaga K, Ikuta K.** 2001. Borna disease virus phosphoprotein binds a
716 neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1. *J. Virol.* **75**:8742-8751.
- 717 36. **Zhang G, Kobayashi T, Kamitani W, Komoto S, Yamashita M, Baba S,
718 Yanai H, Ikuta K, Tomonaga K.** 2003. Borna disease virus phosphoprotein
719 represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB1. *J.*
720 *Virol.* **77**:12243-12251.
- 721 37. **Bajramovic JJ, Münter S, Syan S, Nerhbass U, Brahic M, Gonzalez-Dunia
722 D.** 2003. Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in
723 neurons. *J. Virol.* **77**:12222-12231.
- 724 38. **Formella S, Jehle C, Sauder C, Staeheli P, Schwemmle M.** 2000.
725 Sequence variability of Borna disease virus: resistance to superinfection may
726 contribute to high genome stability in persistently infected cells. *J. Virol.*
727 **74**:7878-7883.
- 728 39. **Geib T, Sauder C, Venturelli S, Hassler C, Staeheli P, Schwemmle M.**
729 2003. Selective virus resistance conferred by expression of Borna disease
730 virus nucleocapsid components. *J. Virol.* **77**:4283-4290.
- 731 40. **Clemente R, de la Torre JC.** 2007. Cell-to-cell spread of Borna disease virus
732 proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated
733 processing of the virus surface glycoprotein. *J. Virol.* **81**:5968-5977.
- 734 41. **Cubitt B, de la Torre JC.** 1994. Borna disease virus (BDV), a nonsegmented
735 RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV
736 ribonucleoproteins are present. *J. Virol.* **68**:1371-1381.
- 737 42. **Clemente R, Sisman E, Aza-Blanc P, de la Torre JC.** 2010. Identification of
738 host factors involved in Borna disease virus cell entry through a small
739 interfering RNA functional genetic screen. *J. Virol.* **84**:3562-3575.

740

741

742

743

744

FIGURE LEGENDS

745

746 **Figure 1: Rescue attempts and characterization of recombinant BDV encoding**

747 **a tetracysteine-tagged BDV-P.** (A) Cartoon of recombinant full-length anti-genome

748 constructs depicting the position of BDV open reading frames fused to GFP,

749 tetracysteine tag (TCT) and/or Flag tag (Flag). Note that only viruses highlighted in

750 red in the figure could be rescued, with the Flag or Fag-TCT tag fused to the C-

751 terminus of BDV-P. (B) Viral growth characteristics of wild-type recombinant BDV

752 (rBDV-Pwt), Flag-tagged rBDV (rBDV-P-Flag) and rBDV dually tagged with Flag and

753 TCT (rBDV-P-Flag-TCT) in Vero cells infected with an initial MOI of 0.01. Infection

754 rate was determined by immunocytochemistry with an N-specific antibody at the

755 indicated time points. Error bars represent standard error of the means of three

756 independent experiments. (C) Viral transcript levels in Vero cells persistently infected

757 with tagged and untagged rBDV. Northern blot analysis was carried out with 5 µg of

758 total RNA from the uninfected or persistently infected Vero cells. A DNA probe

759 comprising nucleotides 976 to 1749 (BDV-N/P/X) was used to visualize the indicated

760 viral RNA species. 18S RNA confirmed that similar amount of RNA were loaded in

761 each lane of the gel (lower panel). (D) Protein levels in Vero cells persistently

762 infected with tagged and untagged rBDV. Cell extracts of Vero cells infected with the

763 indicated viruses were subjected to 13 % SDS PAGE and antigens were visualized

764 with antibodies recognizing BDV-N, BDV-P, Flag and β-tubulin.

765

766 **Figure 2: BDV-P-Flag-TCT and BDV-N interact in infected cells.** Extracts from
767 control Vero cells or Vero cells infected with either wild-type recombinant BDV
768 (rBDV-Pwt) or rBDV dually tagged with Flag and TCT (rBDV-P-Flag-TCT) were
769 subjected to immunoprecipitation using a rabbit polyclonal anti BDV-P antibody.
770 Western blots of fractions (Tot, whole cell extracts and IP, immunoprecipitates) were
771 probed with a rabbit polyclonal anti BDV-P (upper panel) or anti BDV-N (lower panel)
772 antibody.

773

774 **Figure 3: Development and validation of FIAsH-labeling.** (A) Biarsenical dye
775 FIAsH labeling of Vero cells persistently infected with rBDV-P-Flag-TCT. Infected or
776 control cells were FIAsH-labeled as recommended by the vendor (left panel,
777 condition 1), or using optimized conditions including more stringent washes as
778 described in the methods (right panel, condition 2). (B, C) Dual labeling experiments.
779 Following FIAsH-labeling and washing of the dye, cells were fixed and subjected to
780 immunofluorescence staining for BDV-P (B) or BDV-N (C), followed by anti-rabbit
781 Alexa 594-conjugated secondary antibody. The merged images of both stainings are
782 shown on the right. On the last panels are plotted the intensity profiles of green and
783 red fluorescent signals along a line drawn across the cell, indicated by the path of a
784 3-pixel-wide line scan. Bar = 10 μ M.

785

786 **Figure 4: Dynamics of BDV-P protein in persistently infected Vero cells.** (A)
787 Real-time visualization of BDV-P dynamics in persistently infected cells. BDV-
788 infected Vero cells were FIAsH-labeled and observed by confocal microscopy.
789 Images were acquired every 4 min for over 3 h. Note the static behavior of BDV-P

790 within nuclear dots. (B-C) FRAP analysis to evaluate BDV-P dynamics in the nucleus
791 (B) or in the cytoplasm (C). The pre- and post-bleached images are shown, sampled
792 until 70 s post-bleach. The white circles indicate photo-bleached spots and arrow the
793 moment when photo-bleaching was performed. Images were collected at 0.23 s
794 intervals and correction for photo-bleaching due to acquisition was done for each
795 time point after background correction. The left panel shows both experimental and
796 fitted fluorescence recovery curves of FRAP experiments. FRAP recovery curves
797 were averaged and fitted with a diffusion model, as described in Materials and
798 Methods. Each fit allowed the calculation of D (diffusion coefficient), M (percent of
799 mobile fraction) and Chi^2 (on the right of each curve), which confirms that
800 experimental values differ from the estimated values by less than 8% in all cases.
801 Data were generated from 3 independent experiments, for a total of 33 viral nuclear
802 (B) dots and 17 cytoplasmic (C) FRAP measurements. Bar = 5 μM .

803

804 **Figure 5. FLIP experiments after photo-bleaching of cellular compartments.** (A)
805 Rationale for the development of a 2-photon-based FLIP approach to study vSPOTs.
806 A confocal microscope will excite fluorescence throughout the specimen volume (i.e.,
807 above and below the focal point centered in the region of interest, see left panel) and
808 will contribute to the photo-bleached path. In contrast, with a 2-photon microscope,
809 excitation only occurs at the focal plane (see right panel) and photo-bleaching is
810 therefore confined to the vSPOT. (B, C) 2-photon-based FLIP analysis of BDV-P
811 trafficking between vSPOTs (B), and between one vSPOT and the nucleoplasm (C).
812 The arrow points to the vSPOT that was continuously photo-bleached and the circles
813 represent the areas of fluorescence intensity measurements. Images were collected

814 at 1.13 s intervals and images are shown at different time points during FLIP to
815 illustrate the fluorescence decay in the regions of interest. The fluorescent intensities
816 areas were measured and are shown on the right panel, the dark curve
817 corresponding to the permanently photo-bleached area and the grey curve to the
818 other one. Correction for photo-bleaching due to acquisition was done for each time
819 point after background correction. For each condition, FLIP recovery curves were
820 averaged. The figure represents the sum of 3 independent experiments, for a total of
821 10 vSPOTs (B) and 11 nucleoplasm (C) FLIP measurements. (D) Confocal-based
822 FLIP analysis of BDV-P trafficking between the different cellular compartments.
823 Arrow points to the cytoplasmic area that was photo-bleached. Fluorescence
824 intensity measurements were performed in separate areas represented by circles,
825 which were numbered as follows: 1 for cytoplasm, 2 for nucleoplasm and 3 for a
826 nuclear vSPOT. FLIP recovery curves are shown on the right panel and were
827 numbered accordingly. Images were collected at 3.2 s intervals. The figure
828 represents the sum of 3 independent for a total of 15 cytoplasm FLIP measurements.
829 Correction for photo-bleaching due to acquisition was done for each time point after
830 background correction. For each condition, FLIP recovery curves were averaged. Bar
831 = 10 μ M (B, D) and 50 μ M (C).

832

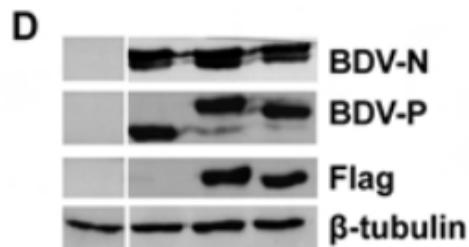
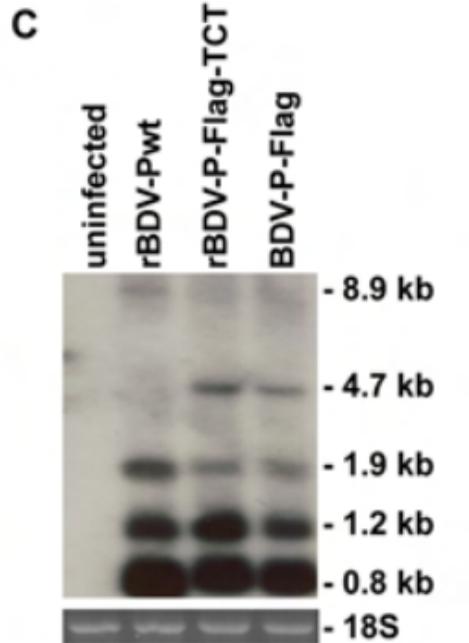
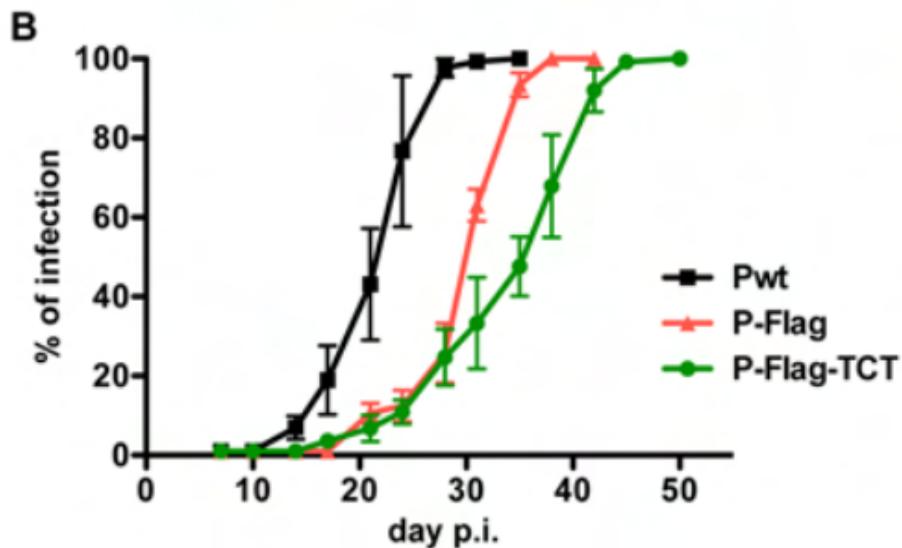
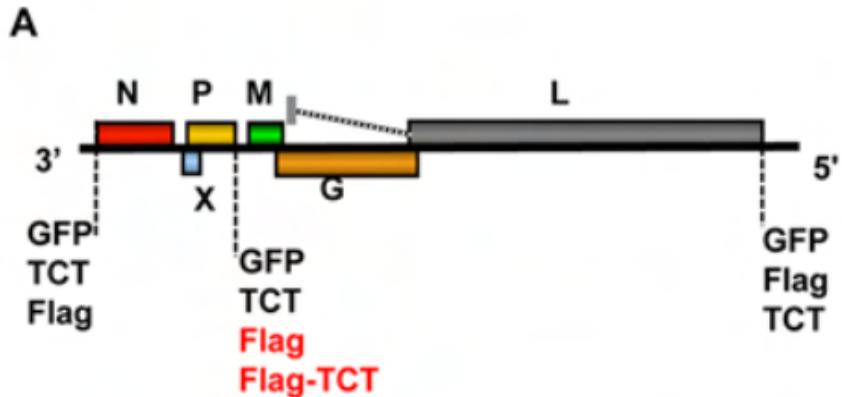
833 **Figure 6: Real-time imaging of BDV intracellular traffic in Vero cells.** (A-C)
834 Visualization of viral transfer between two infected Vero cells. Persistently infected
835 Vero cells were FIAsH-labeled and imaged for 10 h by confocal microscopy. Images
836 were acquired every 4 min. FIAsH-labeled viral material (arrow) was transmitted
837 through a cytoplasmic extension of a neighboring cell and was progressively routed

838 towards the cell nucleus of the cell shown in the figure. (D-F) Visualization of BDV
839 traffic during early stages of infection. Non-infected Vero cells transfected with a
840 mRFP-Cherry expression plasmid (red) were cocultivated with FIAsh-labeled BDV-
841 infected Vero Cells (green). Thereafter, this coculture was imaged by confocal
842 microscopy for 6 h. Images were acquired every 4 min. The arrow points to viral
843 material that was transmitted to the non-infected cell and that was progressively
844 routed towards its nucleus throughout the observation period. Bar = 10 μ M.

845

846 **Figure 7: Cytoskeleton rearrangement is not essential for BDV cell-to-cell**
847 **spread.** Vero cells persistently infected by rBDV-P-Flag-TCT were labeled with
848 FIAsh and treated with 5 μ M cytochalasin D throughout live cell imaging. (A)
849 Validation of cytochalasin D impact on the cytoskeleton network. Cells were treated
850 for different times (1 to 6 hours, results being identical in all cases) and labeled with
851 Alexa 488-conjugated Phalloidin. Bar = 20 μ M. (B,C) two representative examples of
852 cell-to-cell BDV spread using cytochalasin D-treated, FIAsh-labeled BDV-infected
853 Vero cells. These cultures were imaged by confocal microscopy for 6 h. Images were
854 acquired every 4 min. The arrows point to viral material that was transmitted between
855 cells and that was progressively routed towards the nucleus throughout the
856 observation period. Bar = 10 μ M.

857



uninfected

rBDV-Pwt

rBDV-P-Flag-TCT

Tot

IP

Tot

IP

Tot

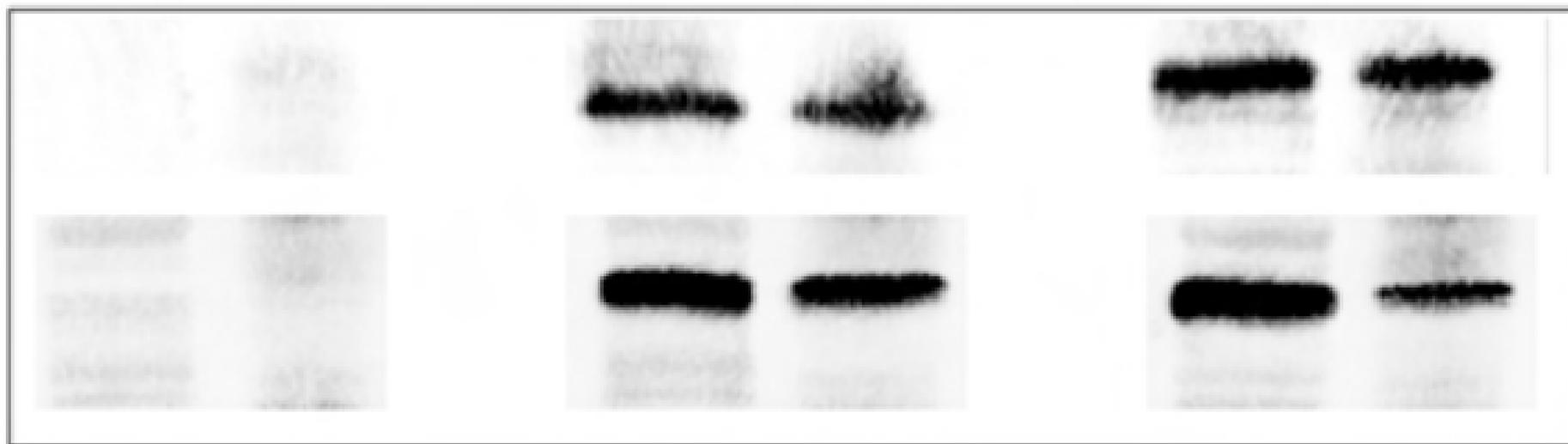
IP

IP anti BDV-P

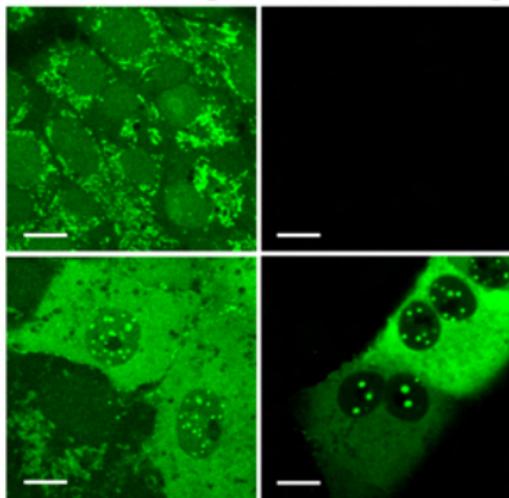
BDV-P

BDV-N

Immunoblots



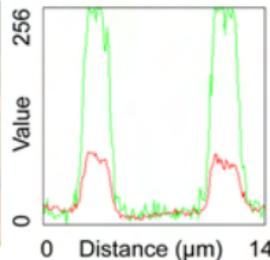
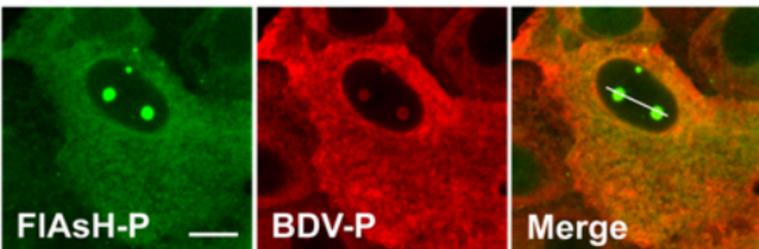
A FIAsH labeling 1 FIAsH labeling 2



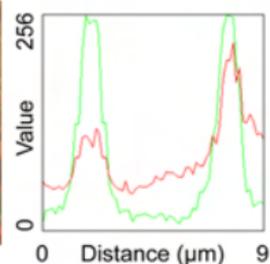
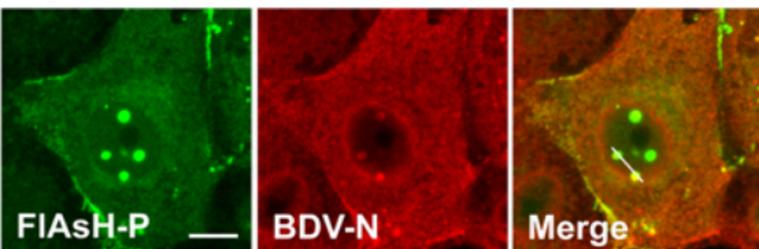
Uninfected

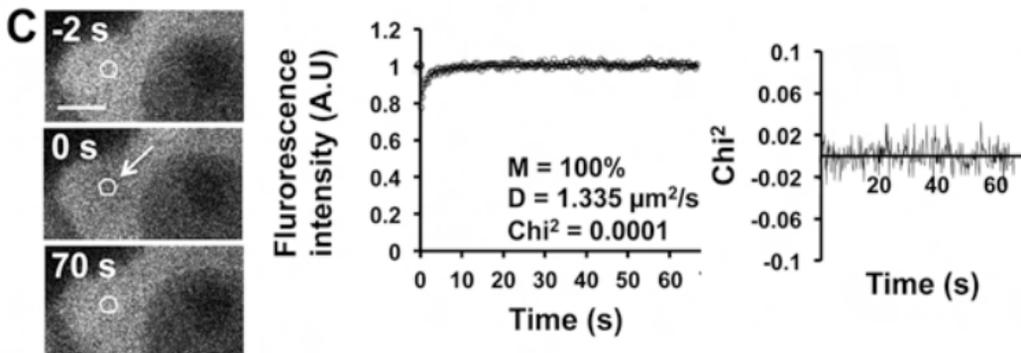
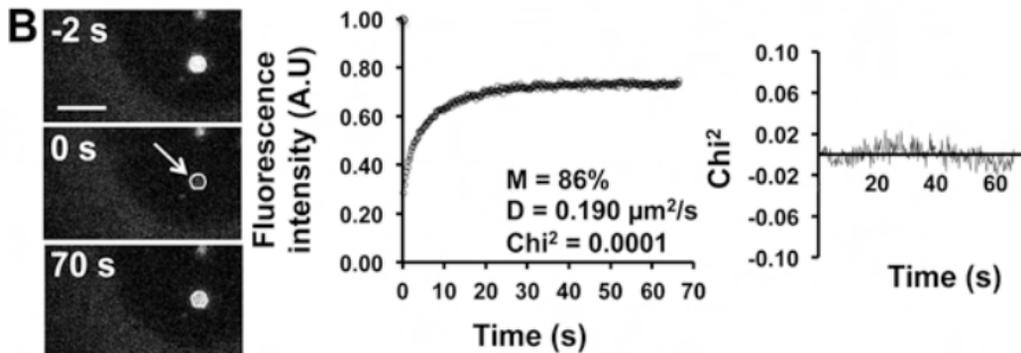
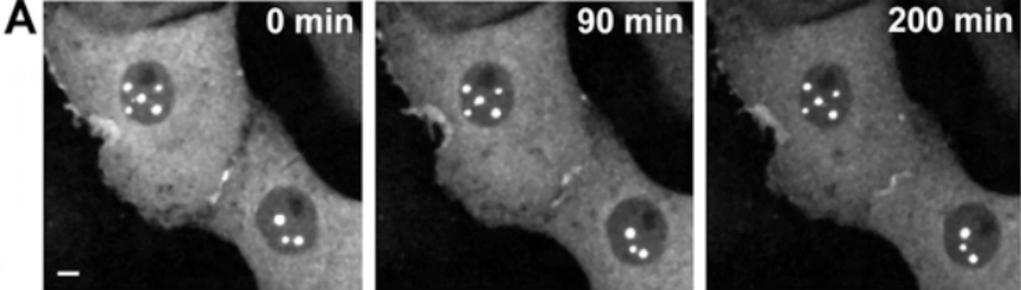
rBDV-P-Flag-TCT

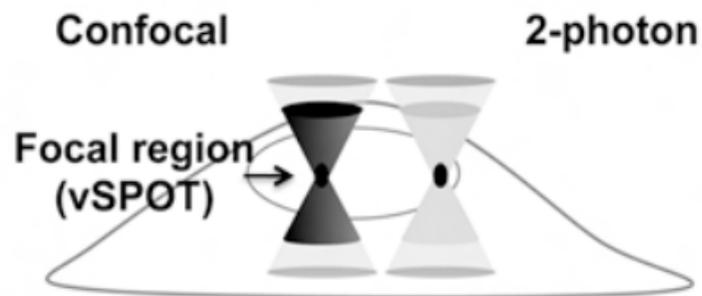
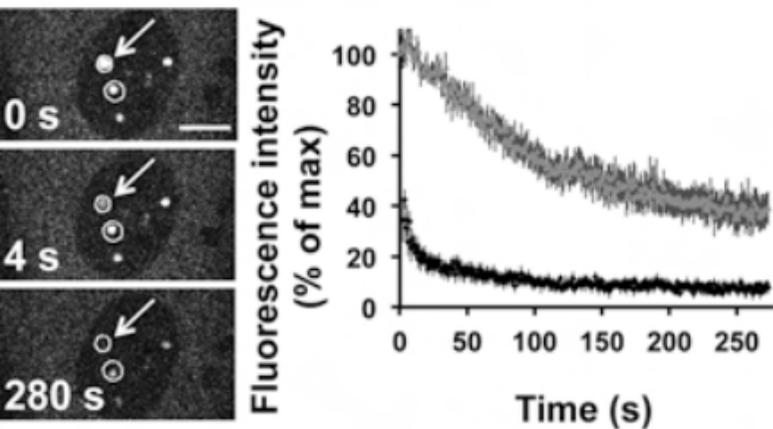
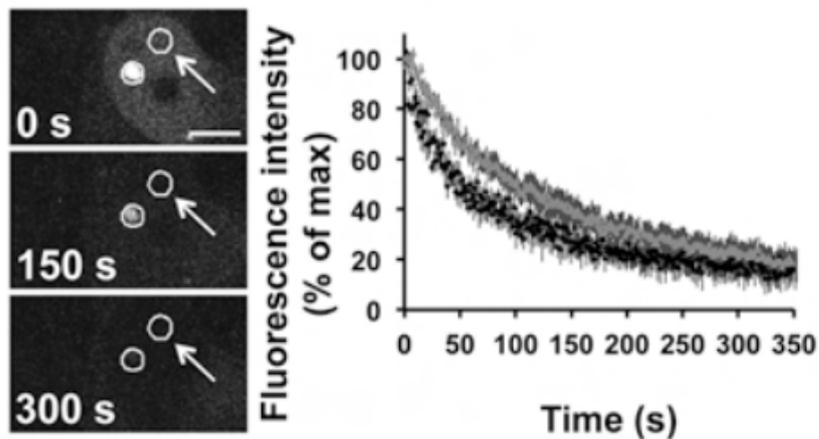
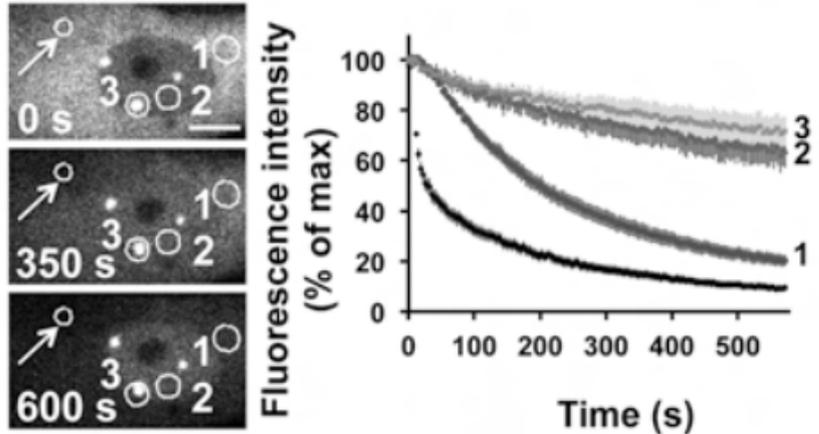
B

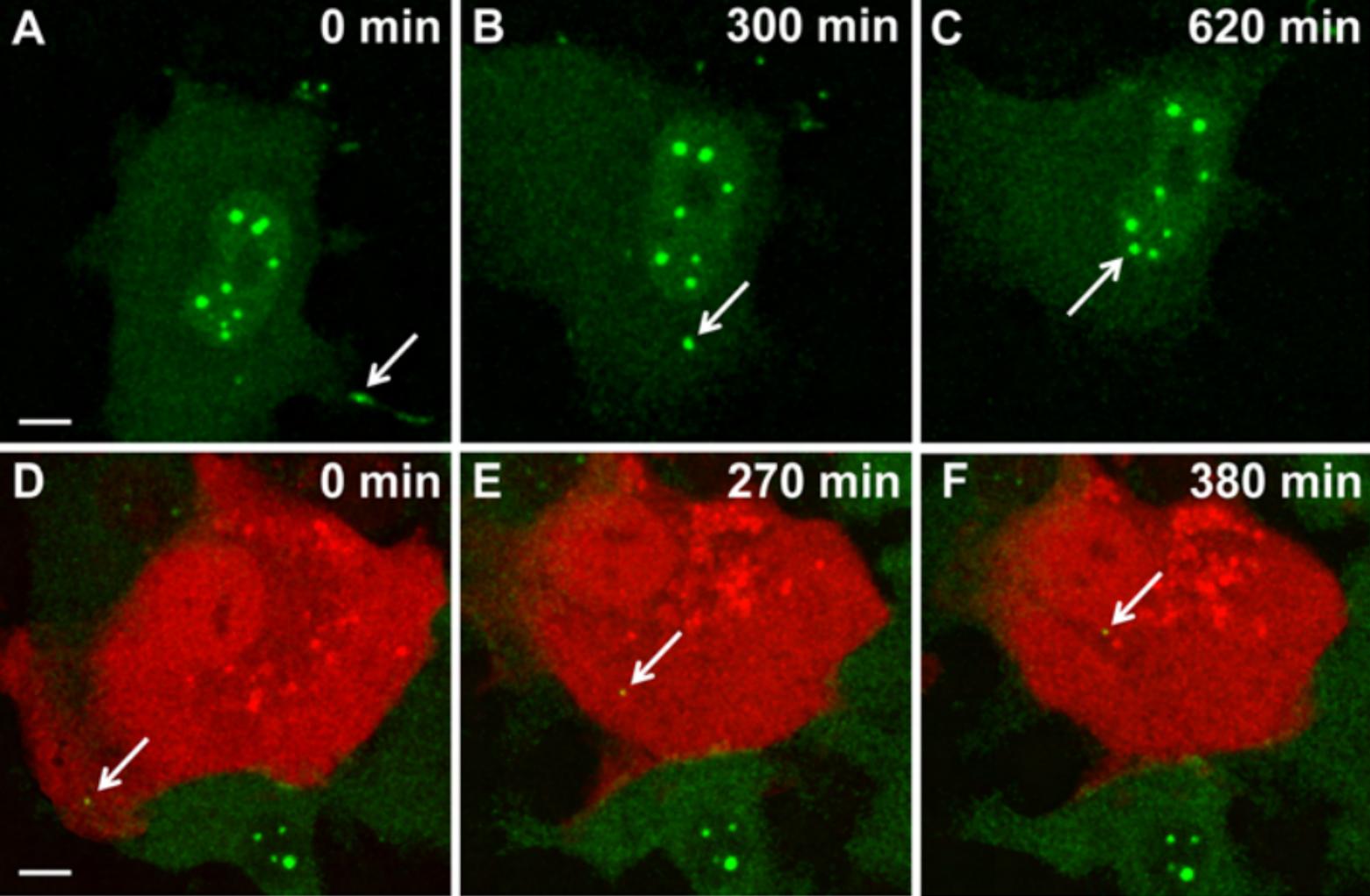


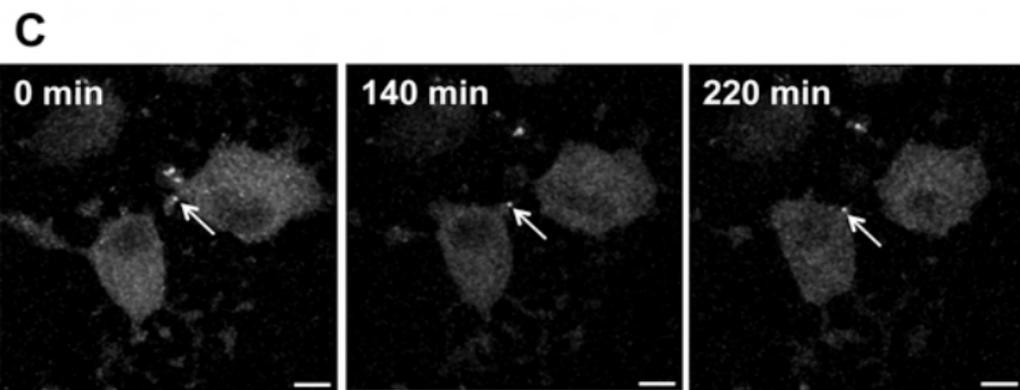
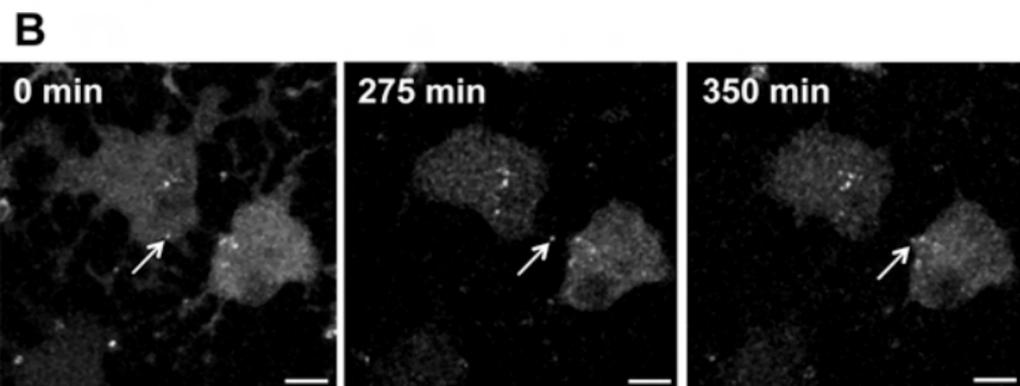
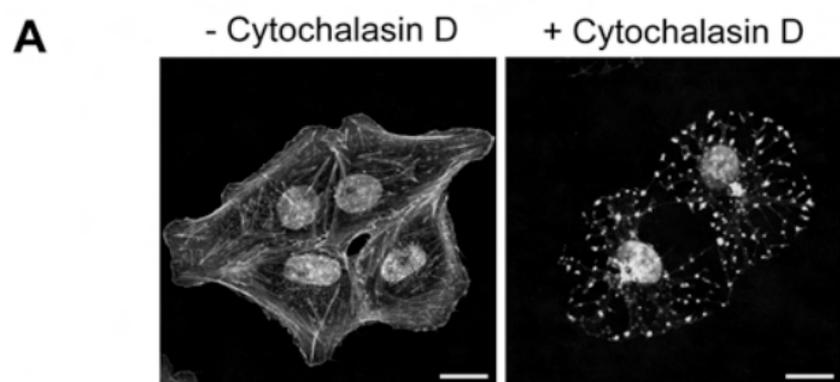
C





A**B****C****D**





II- Analyse du transport axonal du BDV

Bien que le transport axonal soit une étape déterminante pour la réplication et la dissémination des virus neurotropes, les modalités de ce transport sont totalement inconnues dans le cas du BDV.

Nous avons émis l'hypothèse que le BDV pourrait être transporté dans les neurones par le biais des endosomes axonaux sur la base de plusieurs arguments. En effet, comme pour un grand nombre d'éléments transportés par les endosomes axonaux, le BDV pénètre dans la cellule par endocytose dépendante de la clathrine et nécessite la présence de Rab5. Par ailleurs, aucune étude réalisée jusqu'à présent (immunoprécipitation et/ou double hybride) n'a pu démontrer d'interaction directe entre les protéines virales du BDV et les transporteurs cellulaires, comme cela a pu être montré dans le cas d'autres virus. Il est donc probable que le transport du BDV s'effectue par l'intermédiaire d'une vésicule. Enfin, il a été montré que les endosomes axonaux présentent un pH neutre, à la différence des endosomes classiques, ce qui permettrait au virus d'être transporté jusqu'au noyau en évitant la fusion des membranes virales et endosomales et donc la libération prématurée des RNP dans le cytosol.

Nous avons donc déterminé si le BDV utilisait cette voie de transport dans les neurones en utilisant trois approches expérimentales différentes. Nous avons tout d'abord réalisé des analyses de colocalisation par immunofluorescence entre le BDV et d'autres cargos connus pour utiliser les endosomes axonaux, comme la TeNT. Nous avons aussi effectué une approche biochimique de préparation de fractions cellulaires enrichies en endosomes axonaux afin d'y rechercher les constituants viraux. Nous avons enfin abordé le développement d'une nouvelle méthode de purification d'endosomes axonaux par cytométrie en flux. Toutes ces approches étaient basées sur l'utilisation de cultures primaires de neurones infectées ou non par le BDV.

1- Etudes de colocalisation entre le BDV et les endosomes axonaux.

Nous avons établi une collaboration avec le laboratoire de Giampietro Schiavo (London Research Institute, UK), une référence dans le domaine du transport axonal en conditions normales ou pathologiques, en particulier avec Solène Debaisieux, qui nous a fourni du fragment Hc de TeNT couplé à l'Alexa 555, que nous appellerons par la suite Hc-555. Ce fragment Hc de TeNT couplé à un fluorophore étant transporté efficacement dans les endosomes axonaux, il s'agit d'un excellent outil pour les marquer.

Afin de visualiser le virus dans les axones, il faut normalement infecter les neurones avec de grandes quantités de virus et marquer simultanément les endosomes avec Hc-555 (Salinas, Bilsland et al. 2009). Or, comme les titres des préparations virales de BDV sont très faibles, il n'a pas été possible d'utiliser cette approche. Il a donc été nécessaire d'effectuer une étude de la cinétique d'infection des cultures primaires de neurones corticaux par le BDV, afin de déterminer à quel moment le virus commençait à se disséminer dans la culture et où nous pouvions voir des neurones en début d'infection. Dans des neurones corticaux, les modalités de l'infection par le BDV et la taille réduite des prolongements ne nous ont pas permis de visualiser un marquage punctiforme correspondant à un début d'infection et compatible avec des études de colocalisation. Nous avons donc répété ces études sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe. Ces neurones n'ont pas la même morphologie que les neurones corticaux et possèdent notamment des axones plus longs. Avec ces neurones, nous avons déterminé que, dans nos conditions expérimentales, des neurones en début d'infection étaient bien identifiables 8 à 10 jours après mise en culture et ajout du virus.

A ce moment, les neurones ont été incubés avec le fragment Hc-555 afin de marquer les endosomes axonaux, puis les neurones ont été fixés et perméabilisés pour réaliser une immunofluorescence avec des anticorps primaires dirigés soit contre la protéine P, soit contre la protéine N du BDV, les deux composants principaux des RNP. Le cytosquelette composé par la β III tubuline a également été marqué par immunofluorescence afin de vérifier l'intégrité des axones.

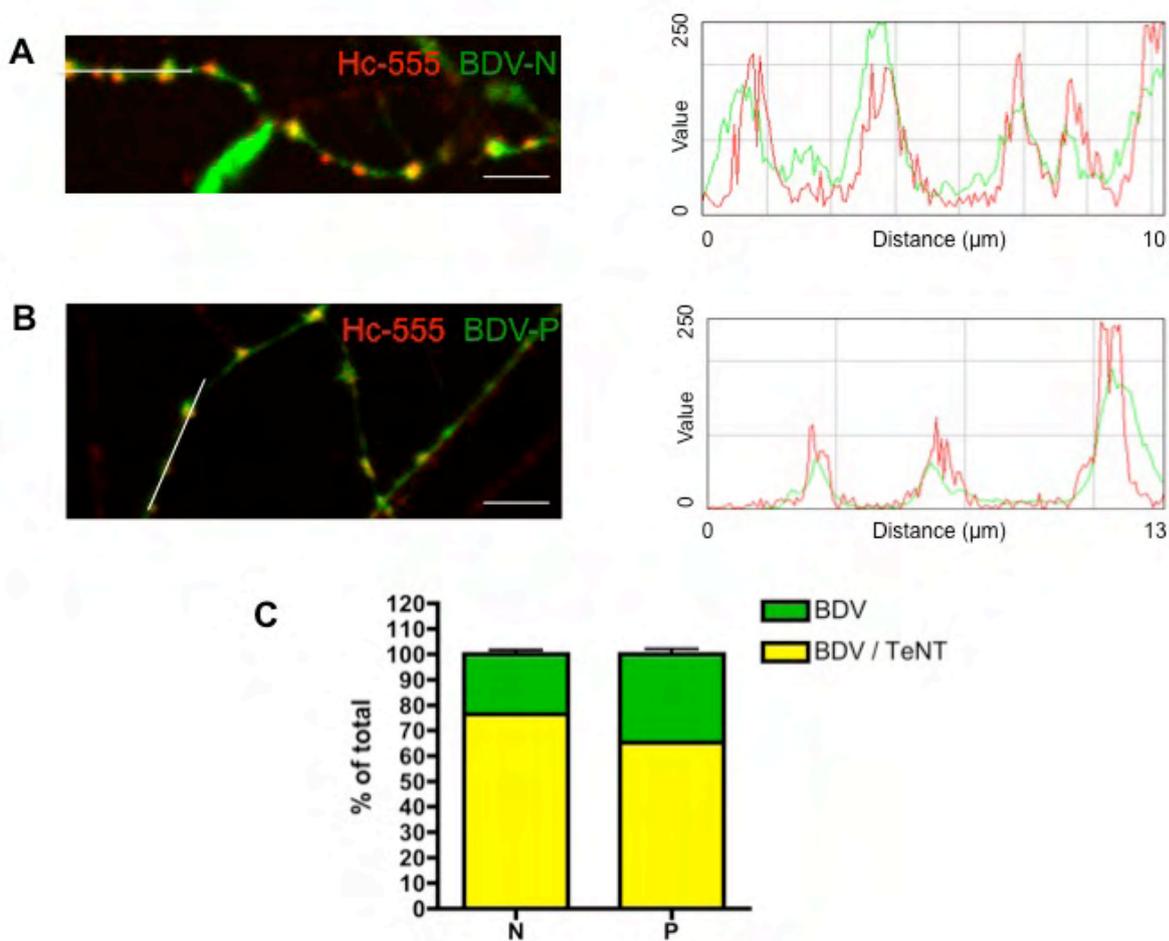


Figure 24 : Etude de la colocalisation entre les protéines N et P du BDV et le fragment Hc de TeNT.

(A) et (B) Les cultures primaires de neurones d'hippocampe infectées par le BDV depuis 10 jours ont été incubées avec le fragment Hc-555 (rouge). Les protéines N (A) ou P (B) du BDV ont ensuite été détectées par immunofluorescence (vert). La ligne blanche sur la photo indique la zone du tracé du profil d'intensité de fluorescence.

(C) Quantification de la colocalisation entre la N ou la P du BDV et Hc-555 dans les axones (colocalisation entre N et Hc555 : 3 expériences indépendantes, 23 champs, 210 vésicules contenant du virus ; colocalisation entre P et Hc555 : 2 expériences indépendantes, 21 champs, 171 vésicules contenant du virus). La partie en jaune de l'histogramme correspond à la colocalisation entre N ou P et Hc-555 et celle en vert correspond à la N ou P seule.

Barre = 5 μm

Pour établir le pourcentage de colocalisation entre Hc-555 et les protéines du BDV, les vésicules contenant la N ou la P et les vésicules contenant à la fois la N ou la P et Hc-555 ont été comptées. Chaque colocalisation a été confirmée par le tracé d'un profil d'intensité de fluorescence (Figure 24). Nous avons obtenu 75% de colocalisation pour Hc-555 et BDV-N et de 65% pour Hc-555 et BDV-P (Figure 24). Il s'agit de très bons pourcentages de colocalisation, comparables à ceux déterminés pour le CAV-2 et la TeNT (Salinas, Bilsland et al. 2009). Les événements où nous n'avons pas détecté de colocalisation pourraient résulter d'une distribution stochastique de ces deux cargos.

Ces premiers résultats sont des arguments forts suggérant que le BDV serait effectivement transporté par les endosomes axonaux. Nous avons ensuite décidé de les confirmer par une approche biochimique de purification des endosomes axonaux et d'immunoprécipitation (IP).

2- Immunoprécipitation des endosomes axonaux.

Le laboratoire de G. Schiavo a développé de nombreuses approches de purification des endosomes axonaux. Les plus fiables reposent sur le marquage des endosomes axonaux à l'aide du fragment Hc couplé à des billes magnétiques, suivi d'une purification à l'aide d'un aimant (Deinhardt, Salinas et al. 2006; Salinas, Bilsland et al. 2009). Il ne nous a pas été possible d'appliquer cette méthode, car le couplage du fragment Hc aux billes magnétiques est labile et doit être réalisé extemporanément. En outre, le tri magnétique repose sur l'utilisation d'un aimant particulier, non disponible dans notre laboratoire. Nous avons alors choisi une approche plus classique d'IP à l'aide d'un marqueur présent à la surface des endosomes axonaux : le récepteur TrkB. Ce type d'approche a d'ailleurs été utilisé récemment pour l'étude des endosomes axonaux dans divers systèmes (Mitchell, Blasier et al. 2012; Zhou, Cai et al. 2012).

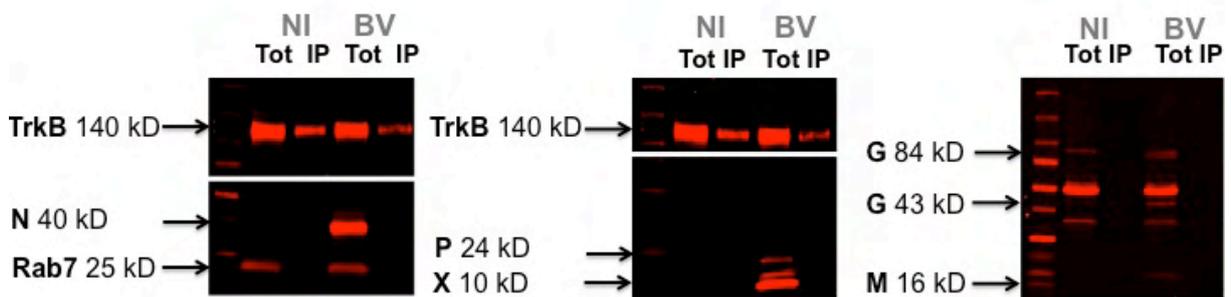


Figure 25 : Etude de l'interaction entre les protéines virales ou Rab7 et TrkB.

« NI » signifie que l'échantillon provient de neurones non infectés et « BV » de neurones infectés. « Tot » correspond à l'échantillon obtenu après lyse totale des neurones. « IP » représente l'échantillon immunoprécipité avec l'anticorps anti-panTrk. Les différentes protéines détectées sont indiquées à gauche de chaque western blot.

Les expériences de fractionnement ont été réalisées à partir de cultures primaires de neurones corticaux et non d'hippocampe, afin de disposer de suffisamment de matériel. Les neurones sont infectés avec le BDV lors de leur mise en culture et les immunoprécipitations (IP) des fractions enrichies en endosomes sont réalisées au bout de treize jours, au moment où la quasi-totalité de la culture neuronale est infectée. Pour cela, les neurones subissent d'abord une lyse ménagée qui permet de préserver les structures endosomales. Nous avons opté pour une lyse mécanique utilisant un «cell cracker», développé à l'EMBL. Le principe de cet appareil repose sur l'homogénéisation du lysat cellulaire dans une chambre calibrée dans laquelle est insérée une bille métallique d'un diamètre déterminé. Comme dans le cas d'un Dounce, l'espace restant dans la chambre d'homogénéisation permet la lyse des éléments de taille supérieure à une certaine valeur, qui est déterminée par le calibre de la bille choisie. Une fois le lysat clarifié, nous avons réalisé des immunoprécipitations avec un anticorps "panTrk", reconnaissant la partie extra-endosomale de toutes les protéines Trk, conjugué à l'agarose ou à des billes magnétiques, avant d'analyser la composition des immunoprécipitats par western blot.

Nous avons tout d'abord réalisé des contrôles en effectuant une lyse totale des échantillons, au cours de laquelle les endosomes sont également détruits. Même si les protéines Trk et Rab7 (un autre marqueur des endosomes) sont détectés dans ce lysat total, Rab7 n'est pas co-immunoprécipité par l'anticorps anti-Trk, confirmant que Rab7 n'interagit pas directement avec Trk (Figure 25). Il en est de même dans les neurones infectés pour les protéines virales N, P, M et G, qui sont présentes uniquement dans les lysats totaux (Figure 25). Il n'y a donc pas d'interaction directe de ces protéines avec les récepteurs Trk.

Nous avons ensuite répété ces expériences d'immunoprécipitation à partir des fractions enrichies en endosomes axonaux. Dans ce cas, nous détectons Rab7 dans l'immunoprécipitat, associé à Trk. Comme Rab7 est présente à la surface des endosomes et n'interagit pas directement avec Trk, ces résultats suggèrent que

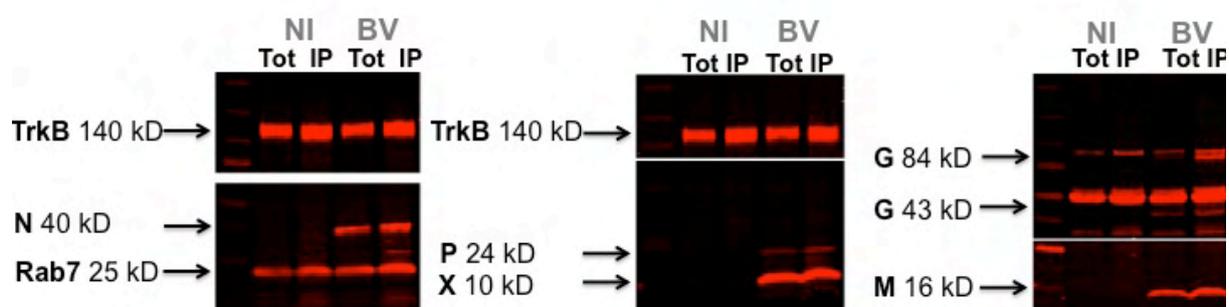


Figure 26 : Etude de la présence des protéines virales dans des fractions enrichies en endosomes axonaux immunoprécipitées avec un anticorps anti-panTrk.

« NI » signifie que l'échantillon provient de neurones non infectés et « BV » de neurones infectés. « Tot » correspond à l'échantillon total prélevé avant l'immunoprécipitation. « IP » représente l'échantillon immunoprécipité avec l'anticorps anti-panTrk. Les différentes protéines détectées sont indiquées à gauche de chaque western blot.

l'intégrité des endosomes axonaux a été préservée par les conditions de lyse ménagée des neurones. Dans les IP réalisées sur les neurones infectés, nous avons détecté les protéines virales suivantes : la protéine N (40 kDa), la protéine P (24 kDa), la protéine X (10 kDa), la protéine M (16 kDa) et les deux formes de la protéine G (84 kDa et 43 kDa) (Figure 26). Malgré de nombreux essais d'optimisation, les résultats obtenus avec l'anticorps anti-G ne sont cependant pas très satisfaisants et laissent apparaître de nombreuses bandes non spécifiques. Nous distinguons cependant les deux formes de la protéine G, qui n'apparaissent pas dans les IP à partir de cellules non infectées.

Ces résultats, qui suggèrent que le virus serait transporté sous forme entière dans les endosomes, doivent cependant être nuancés. En effet, la protéine TrkB suit une voie de sécrétion classique et transite par le RE et l'appareil de Golgi avant d'être exprimée à la membrane plasmique, puis internalisée dans les endosomes. Il est donc tout à fait possible que nos préparations enrichies en endosomes contiennent également des fractions de RE ou de l'appareil de Golgi. Effectivement, nous avons observé que nos immunoprécipitations anti-Trk permettent également d'immunoprécipiter la calnexine et ERGICp53/p58 (des marqueurs du RE) ou GM130, un marqueur de l'appareil de Golgi. Une publication récente suggère même qu'une fraction de TrkB serait également présente à la mitochondrie, suggérant que cet organite est aussi présent dans nos fractions immunoprécipitées (Wiedemann, Siemen et al. 2006).

Il est donc difficile de conclure quant à la présence des protéines M et G dans les endosomes axonaux, car ces protéines suivent une voie de maturation qui transite par le RE et l'appareil de Golgi. Le même problème est rencontré avec la protéine X qui est localisée dans la mitochondrie. En revanche, les protéines virales N et P sont traduites dans le cytoplasme et ne subissent pas de modifications post traductionnelles nécessitant un passage dans le RE et l'appareil de Golgi. Leur présence dans les endosomes axonaux, qui est en accord avec les résultats d'immunofluorescence, semble donc établie. Nous pouvons donc supposer que les RNP sont transportées dans ces endosomes, mais nous ne pouvons pas déterminer si le virus est transporté sous sa forme enveloppée ou non. Afin de préciser ce point, il nous a semblé nécessaire de développer une autre approche expérimentale permettant d'obtenir des fractions endosomales de pureté supérieure.

3- Purification des endosomes axonaux par cytométrie en flux.

Nous avons alors développé une approche basée sur la cytométrie de flux, dans le but d'obtenir des fractions pures en endosomes axonaux. Le principe repose sur un tri par cytométrie en flux d'endosomes marqués à partir de lysats neuronaux. Le marqueur idéal pour ce type d'approche est le fragment Hc, qui est d'ailleurs utilisé par nos collaborateurs à Londres pour des purifications par tri magnétique avant analyse en spectrométrie de masse. Comme il est nécessaire de disposer de grandes quantités de fragment Hc fluorescent pour ces expériences, nous avons au préalable effectué des expériences de mise au point de ce protocole en utilisant la sous unité B de la toxine cholérique (CT-B) couplée à un fluorophore, qui est disponible commercialement. CT-B correspond à un fragment non toxique de la toxine cholérique capable de reconnaître son récepteur et d'être transporté dans les neurones par les endosomes axonaux, tout comme pour le fragment Hc. Cependant, à la différence de Hc qui reste synaptique, CT-B est ensuite adressée à l'appareil de Golgi puis au RE, ce qui induit les mêmes limitations que précédemment pour l'analyse.

Etant donné la taille réduite des endosomes axonaux, qui est estimée entre 100 et 500 nm, le tri par cytométrie en flux nécessite le développement de procédures adaptées au tri de petites particules. Ces approches ont été développées en collaboration avec F. L'Faqih et V. Duplan, les ingénieures du plateau technique du Centre. Nous avons tout d'abord utilisé des billes de calibration non marquées de tailles définies (100 nm, 500 nm, 1 μ m et 3 μ m) afin de vérifier si le trieur était capable de les différencier du bruit de fond, sur la base des seuls critères de taille et granulosité. Nous avons observé que le trieur était bien capable de différencier les billes de 1 μ m et 3 μ m mais pas celles de 100 nm et 500 nm. Afin d'augmenter la résolution du tri en rajoutant le critère de fluorescence, nous avons alors utilisé un mélange de billes de calibration fluorescentes (500 nm, 900 nm et 3 μ m). Dans ce cas, les trois populations de billes étaient clairement discriminables du bruit de fond de l'appareil. Une fois les paramètres d'acquisition et d'analyse définis, nous avons entamé des expériences de tri avec préparations d'endosomes marquées avec la CT-B.

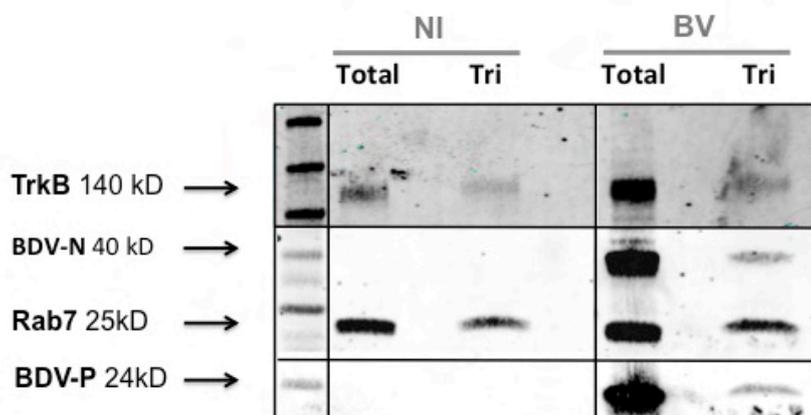


Figure 27 : Etude de la présence des protéines virales dans des fractions purifiées au trieur.

« NI » signifie que l'échantillon provient de neurones non infectés et « BV » de neurones infectés. « Total » correspond à l'échantillon total prélevé avant le tri. « Tri » représente l'échantillon trié avec le fragment Hc 633. Les différentes protéines détectées sont indiquées à gauche de chaque western blot.

Nous avons suivi un protocole similaire à celui décrit pour les immunoprécipitations, utilisant des cultures de neurones primaires, 13 jours après leur mise en culture. Les neurones ont été marqués avec la CT-B couplée à l'Alexa Fluor 488, pendant 3 heures afin de permettre l'internalisation et le marquage des endosomes. L'excès de CT-B non internalisée dans les neurones a ensuite été éliminé par un bref lavage à l'acide, avant lyse ménagée à l'aide du "cell cracker". Après le tri, la présence des endosomes a été vérifiée par détection de TrkB et de Rab7 par western blot.

La première expérience de tri réalisée sur des neurones non infectés ne nous a permis d'obtenir que très peu d'endosomes. Nous avons alors encore modifié les paramètres de tri, en augmentant notamment la vitesse de tri, ce qui nous a permis d'obtenir plus d'évènements lors des expériences suivantes. Malheureusement, la qualité de l'échantillon obtenu n'était pas suffisante pour permettre la détection de Rab7 et de TrkB par western blot.

Lors de la mise au point de cette procédure, une équipe allemande a développé une méthode de tri d'endosomes à partir de cellules non neuronales, confirmant que la cytométrie de flux est bien adaptée pour la purification de ces organelles (Achmet Imam Chasan 2013). Cette méthode nous a fourni des informations précieuses qui ont facilité le développement de notre propre protocole à partir de cultures de neurones. Nous avons notamment changé le tampon de lyse des neurones et remplacé le liquide de gaine du cytomètre par du PBS stérile. Enfin, nous nous sommes procurés du fragment Hc couplé à l'Alexa Fluor 633, un marqueur plus spécifique des endosomes que la toxine cholérique. Le changement de l'ensemble de ces paramètres nous a permis de trier efficacement les particules marquées avec l'Alexa Fluor 633. L'analyse du contenu par WB a révélé la présence des protéines spécifiques des endosomes TrkB et Rab7 ainsi que les protéines N et P dans les fractions purifiées à partir des neurones infectés (Figure 27). Ces résultats confirment donc la présence des RNP dans les endosomes axonaux. Nous pourrions maintenant déterminer la présence l'ARN génomique par RT-PCR et après vérification de la pureté du tri, nous pourrions rechercher la présence des constituants viraux comme décrit précédemment.

DISCUSSION

I- Etude du trafic intracellulaire du BDV

Au cours de mon travail de thèse, nous avons produit et caractérisé le premier BDV recombinant dont une des protéines de la RNP peut être marquée de façon fluorescente. Bien que ce virus soit infectieux et nous ait permis d'obtenir des informations nouvelles, nous avons observé que l'insertion des séquences Flag et TCT a notablement affecté la biologie de ce virus. Ceci était assez inattendu, car le principe de la technologie TCT était basé sur l'hypothèse que cette séquence de taille réduite offrirait une alternative à la GFP en perturbant peu la réplication virale. De fait, l'insertion de la séquence TCT dans le génome d'autres virus tels que le VIH (Arhel, Genovesio et al. 2006; Gousset, Ablan et al. 2008) ou le VSV (Virus de la stomatite vésiculaire) (Das, Panda et al. 2009; Mire, Dube et al. 2009) n'a effectivement pas eu d'effet significatif sur la production de particules ou la dissémination de ces virus. Le BDV se distingue donc des autres virus par la difficulté à manipuler son génome et sa relative intolérance à l'ajout de séquences supplémentaires. Ceci tient probablement à l'extrême compacité du génome du BDV et au fait que la protéine P joue un rôle essentiel dans la réplication et la transcription virales. Le retard de dissémination de notre virus recombinant en culture cellulaire est probablement lié à des étapes de réplication et de transcription altérées, comme l'attestent les résultats de Northern blot, avec une modification du rapport entre les différents ARN sub génomiques plutôt qu'à un problème de transport du virus, puisqu'il dissémine à la même vitesse durant la phase exponentielle d'infection. Quoiqu'il en soit, comme nous n'avons pas noté de différence drastique dans la production des protéines virales et dans le transport du virus, il nous a semblé que ce virus recombinant était utilisable pour visualiser le trafic intracellulaire des RNP par imagerie en temps réel.

Dans la lignée cellulaire rBDV-P-Flag-TCT, nous avons mis en évidence que les vSPOT sont très statiques durant de longues périodes d'observation, alors que dans le cytoplasme les RNP sont beaucoup plus mobiles. Ces vSPOT étant le site de réplication et transcription du BDV, nous nous attendions en effet à ce qu'ils soient plus mobiles. L'analyse détaillée de la dynamique de la protéine P dans ces

structures, par des approches de FRAP et de FLIP, nous a permis de confirmer et de compléter le modèle précédemment décrit par K. Tomonaga et son équipe (Matsumoto, Hayashi et al. 2012). L'ensemble de ces travaux nous permet de proposer le modèle suivant :

Dans les vSPOT, la protéine N permet de lier la RNP à la chromatine, via son interaction avec les histones. Elle est donc extrêmement statique et indispensable à la formation des vSPOT. Il a d'ailleurs été décrit que l'infection par le BDV perturbe le profil d'acétylation des histones (Suberbielle, Stella et al. 2008). Ceci pourrait être mis en corrélation avec l'interaction des protéines virales avec la chromatine. Ceci pourrait être à l'origine de perturbations de l'expression de certains gènes cellulaires, qui sont encore mal comprises et restent à être caractérisées en détail.

La fraction statique de la protéine P correspond vraisemblablement à la fraction présente dans la RNP fixées sur la chromatine, lui permettant ainsi de jouer son rôle de cofacteur de la polymérase.

Nos analyses de FRAP ont révélé que la fraction mobile de la P dans le noyau présente un coefficient de diffusion égal à $0.190\mu\text{m}^2/\text{s}$. Cette valeur est très comparable à celles qui ont été précédemment décrites pour des protéines associées aux nucléosomes, telles que HMG-17, et nettement inférieure à celles calculées pour des protéines libres dans le noyau (Phair and Misteli 2000). Il est donc probable que ceci soit lié au déplacement de la P entre les vSPOT en association avec son partenaire cellulaire HMGB1.

HMGB1 joue un rôle important dans l'architecture de la chromatine et se lie aux nucléosomes et il a été précédemment montré que l'interaction de la P avec HMGB1 permet de stabiliser l'interaction des vSPOT avec la chromatine (Matsumoto, Hayashi et al. 2012). Cette protéine est d'ailleurs associée aux vSPOT, dont elle est l'un des composants cellulaires. Lorsque l'on abolit son expression ou son interaction avec la P, les vSPOT ne s'associent plus avec la chromatine et le BDV perd sa capacité à persister au sein d'une culture cellulaire. HMGB1 pourrait donc interagir avec la fraction statique et mobile de la P et interviendrait dans la régulation de l'interaction de la P avec les RNP au sein des vSPOT.

Afin de confirmer le rôle de l'interaction de la P avec HMGB1 dans la dynamique de la protéine P dans le noyau, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences de FRAP et de FLIP avec un virus recombinant dont la P ne peut plus se lier à HMGB1. Si la P interagit seulement avec HMGB1, ce mutant de la P sera

alors complètement mobile et présentera un coefficient de diffusion beaucoup plus important. Si la P n'interagit pas avec HMGB1, il n'y aura aucun changement dans sa dynamique. Enfin, si la P interagit avec HMGB1 et une autre protéine, la fraction statique sera diminuée et la fraction mobile présentera un coefficient de diffusion beaucoup plus grand.

HMGB1 joue aussi un rôle important dans la réplication et transcription du BDV, en augmentant l'activité de la polymérase virale. En effet, l'activité de la polymérase est fortement réduite en présence d'un siRNA pour HMGB1 (Matsumoto, Hayashi et al. 2012). De façon intéressante, HMGB1 augmente aussi l'activité de transcription/réplication de la polymérase du virus de la grippe, un virus qui se réplique également dans le noyau (Moisy, Avilov et al. 2012). Ceci permet une augmentation de la synthèse des protéines et particules virales du virus. Une des hypothèses serait que l'interaction de la nucléoprotéine du virus de la grippe avec HMGB1 faciliterait le recrutement des RNP sur la chromatine au niveau des zones de transcription cellulaire actives, augmentant ainsi l'efficacité de transcription de polymérase virale. Le même mécanisme pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'activité de la polymérase virale du BDV.

De façon analogue aux vSPOT du BDV, le virus de la rage induit la formations de structures appelées corps de Negri dans la cellule, qui constituent son site de réplication et de transcription cytoplasmique (Lahaye, Vidy et al. 2009). Il a été démontré que le Toll-like receptor 3 (TLR 3) est également associé à ces corps de Negri et semble indispensable à leur formation. Cette séquestration du TLR pourrait constituer un moyen d'échappement du virus à l'activation de la réponse immune innée. De plus, l'intégrité des neurones étant nécessaire à la propagation du virus de la rage au niveau du SNC, la séquestration du TLR 3 pourrait aussi permettre de prévenir l'apoptose induite par le TLR 3. Il serait donc intéressant de rechercher la présence de senseurs de l'immunité antivirale dans les vSPOT, même si une grande partie de ces protéines sont généralement plutôt localisées dans le cytosol, ainsi que d'étudier leur rôle dans le cycle viral du BDV.

Nos analyses par imagerie des cellules Vero-rBDV-P-TCT ont permis de mettre en évidence une accumulation de matériel viral au niveau des contacts entre

deux cellules infectées, qui est échangé entre les cellules, entre dans le cytoplasme puis est transporté jusqu'au noyau. Ceci est surprenant, car il est connu que les cellules sont normalement résistantes à la surinfection par le BDV et que la stœchiométrie des protéines N et P est un paramètre essentiel au bon fonctionnement de la polymérase virale (Formella, Jehle et al. 2000; Geib, Sauder et al. 2003) (Schneider, Naegele et al. 2003). Il est donc possible que cette résistance à la surinfection survienne lors d'une étape postérieure à l'entrée du virus, par exemple lors de l'adressage des RNP dans le noyau. Ces données mettent une fois de plus en évidence l'originalité du BDV. En effet, les mécanismes de résistance à la surinfection pour beaucoup de virus reposent souvent sur la diminution de l'expression de leur récepteur à la surface de la cellule. Cette résistance à la surinfection a donc lieu durant les étapes précoces de l'infection, à l'opposé de ce que nous avons observé pour le BDV.

Enfin, nous avons visualisé les étapes précoces de l'infection. Nous avons calculé que le virus met environ 5 heures pour rejoindre le noyau, suggérant qu'il est transporté par les moteurs du cytosquelette d'actine et des MT, comme la majorité des virus. Il serait intéressant de tester la contribution respective de chacun de ces moteurs durant les différentes phases précédant l'entrée du virus dans le noyau grâce à l'utilisation de drogues.

Il serait également important de préciser les mécanismes impliqués dans le passage du virus d'une cellule à l'autre, notamment la contribution de la glycoprotéine virale dans ces processus. En effet, Clemente et de la Torre ont émis récemment l'hypothèse que le BDV infecterait en premier lieu une population spécifique de neurones du SNC par un mécanisme dépendant de la fixation de la glycoprotéine sur son récepteur. Ensuite, la propagation du virus au reste du cerveau se ferait par dissémination de cellule à cellule ne nécessitant plus la présence de ce récepteur à la surface des cellules cibles (Clemente and de la Torre 2007). Il serait donc intéressant de connaître la contribution de la glycoprotéine dans le passage entre deux cellules Vero et de déterminer sous quelle forme (particule virale ou RNP) le virus passe d'une cellule à l'autre. Les films que nous avons réalisés montrent un passage de cellule à cellule par l'intermédiaire de contacts cytoplasmique. De plus, même si le BDV produit très peu de particules virales libres, il se dissémine très efficacement au sein d'une culture cellulaire. Ces deux arguments seraient en faveur

d'un passage sous la forme de RNP. Enfin, nous pourrions tester la contribution du cytosquelette dans le transfert du virus. Nous avons déjà testé la contribution du cytosquelette d'actine, en effectuant une analyse par imagerie dynamique sur des cellules Vero infectées en présence de cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation du cytosquelette d'actine. La transmission du virus d'une cellule à l'autre ne semble pas affectée par la présence de cette drogue, suggérant que l'intégrité du cytosquelette d'actine n'est pas indispensable pour le transfert du virus d'une cellule à l'autre. Ces données sont surprenantes, puisque l'actine corticale tapisse l'intérieur de la membrane plasmique et est donc souvent impliquée dans le mouvement de la membrane plasmique. De plus, elle est souvent le composant majeur des synapses formées entre deux cellules telles que les synapses virologiques ou immunologiques. Il serait maintenant intéressant d'étudier la contribution des microtubules, en utilisant des drogues telles que le nocodazole, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules.

Cependant, ces approches risquent de se heurter à plusieurs limitations avec les outils dont nous disposons actuellement, notamment le fait que les événements d'infection sont très rares et que les expériences faisant appel à l'imagerie ne nous permettent d'analyser que peu de cellules à la fois.

En conclusion, l'insertion de l'étiquette TCT dans notre virus recombinant nous a permis d'obtenir le premier BDV recombinant visualisable par imagerie en temps réel. Cependant, nous nous sommes heurtés à beaucoup de problèmes techniques, notamment liés à la difficulté d'optimiser les conditions de marquage FIAsh. Par exemple, il ne nous a pas été possible de poursuivre cette étude dans les neurones, à cause de sa toxicité (cf. discussion sur le transport axonal). De plus, ce marquage étant très photosensible, son excitation répétée entraîne une diminution rapide de la fluorescence ce qui complique grandement les conditions d'imagerie.

Nous envisageons donc à l'avenir de développer une alternative à l'utilisation de cette étiquette TCT, notamment en construisant un virus basé sur la technique "split-GFP", à l'instar de ce qui a été récemment décrit pour le virus de la grippe (Avilov, Moisy et al. 2012). Ce système repose sur la possibilité de dissocier la GFP en deux fragments trans-complémentants. Dans ce système il est possible d'exprimer séparément un grand fragment GFP1-10, constitué des 214 acides

aminés N-terminaux de la GFP et un petit fragment, GFP11, constitué des 16 acides aminés C-terminaux. GFP11 est généralement associé à la protéine d'intérêt et GFP1-10 est exprimé en *trans*, par expression transitoire ou stable, dans les cellules permissives à l'infection. Lorsqu'ils sont présents dans la même cellule, ces deux fragments s'associent de manière spontanée et irréversible pour former un complexe stable et fluorescent. Cette technique a récemment été utilisée pour marquer la protéine PB2 du virus de la grippe (Avilov, Moisy et al. 2012). L'insertion de l'étiquette GFP11 ne perturbant pas la multiplication du virus, le virus recombinant a pu être utilisé pour étudier le cycle viral. La construction d'un BDV recombinant dont l'une des protéines de la GFP est couplée à GFP11 est actuellement en cours de développement dans l'équipe du Pr Martin Schwemmler.

Une autre alternative serait l'utilisation du BDV recombinant dans lequel une unité de transcription supplémentaire a été insérée (Daito, Fujino et al. 2011). Il serait alors possible d'insérer un gène codant pour la P ou la N couplés à une GFP ou une Split GFP dans cette cassette. Il reste cependant, à déterminer si une telle insertion ne perturbe pas trop la stœchiométrie des protéines N et P et donc l'activité de la polymérase virale, ce qui pourrait conduire à un virus non infectieux.

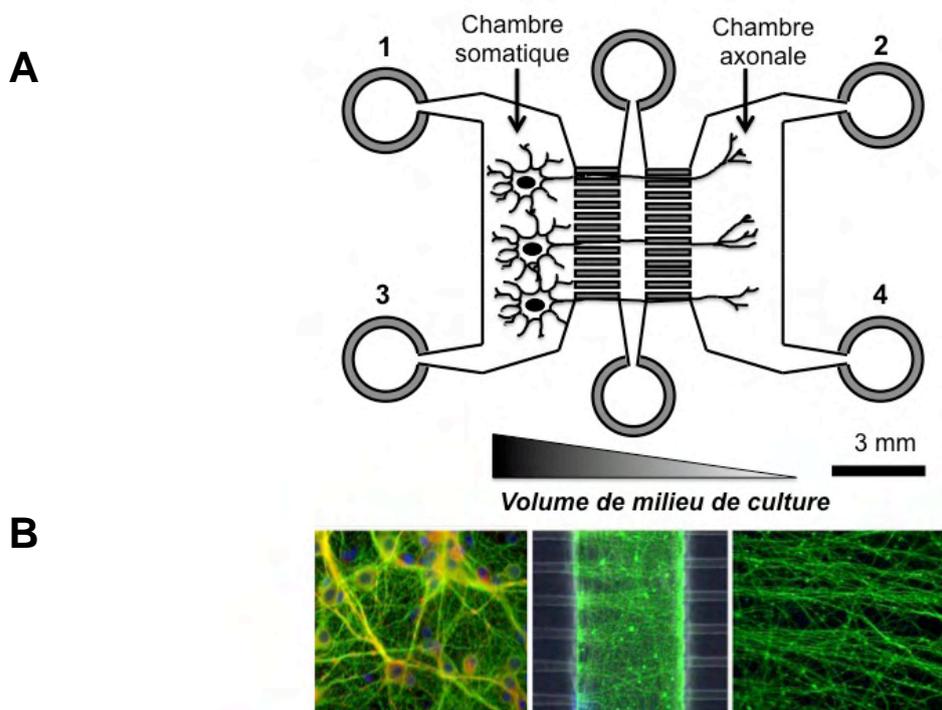


Figure 28: Culture de neurones corticaux de rat dans des chambres microfluidiques.

(A) Schéma d'une chambre microfluidique.

(B) Neurones cultivés dans des chambres microfluidiques. Les corps cellulaires sont dans la chambre somatique, les axones projettent dans la chambre axonale en passant par les microcanaux (Kilinc, Peyrin et al. 2010).

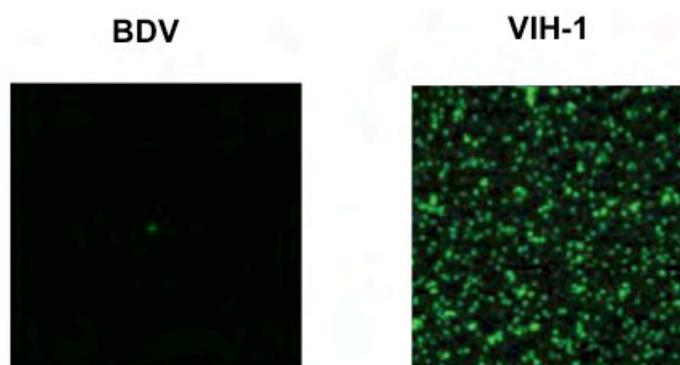


Figure 29 : Particules de BDV purifiées après marquage avec le réactif FIAsh.

A titre de comparaison du rendement obtenu pour le BDV, le panneau de droite montre les résultats obtenus par (Arhel, Genovesio et al. 2006) où la même procédure a été réalisée dans le cas du VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1).

II- Analyse du transport axonal du BDV

Notre première idée dans ce projet était d'utiliser le BDV fluorescent (préparé à partir de cellules infectées avec le virus rBDV-P-Flag-TCT) pour visualiser le déplacement du virus dans des cultures de neurones par imagerie cellulaire en temps réel. De plus, nous avons envisagé d'utiliser des neurones cultivés de manière orientée dans des chambres microfluidiques. Dans ces chambres, les corps cellulaires sont séparés des axones par des microcanaux (Figure 28) et le maintien d'une différence de pression hydrostatique entre les compartiments permet d'isoler les environnements somatiques et axonaux. En fonction du site d'infection, il est donc possible en théorie d'étudier les modalités des transports antérograde ou rétrograde.

Nous avons donc développé plusieurs approches afin de pouvoir disposer de virus libre fluorescent pour infecter les neurones.

Nous avons tout d'abord cherché à infecter les neurones avec des particules virales libres préalablement marquées avec le réactif FIAsh. Cependant, les faibles titres caractéristiques du BDV et le fait que le marquage FIAsh et la purification du virus marqué entraînent encore une diminution de ce titre rend cette approche irréalisable. Nos essais de purifications montrent en effet que l'on peut obtenir qu'un très petit nombre de particules virales du BDV marquées, ce qui est incompatible avec une étude par imagerie, contrastant avec ce qui a été décrit pour le VIH dont l'intégrase comportait une séquence TCT (Figure 29) (Arhel, Genovesio et al. 2006).

Nous avons ensuite tenté d'infecter les neurones avec du virus provenant des cellules Vero rBDV-P-TCT, avant marquage avec le réactif FIAsh. Cependant, nous n'avons pas réussi à adapter les conditions de marquage sur les neurones pour éliminer totalement le marquage non spécifique, comme nous l'avons fait avec les cellules Vero. De plus, nous avons constaté lors des expériences d'imagerie que le BAL (le réactif utilisé pour éliminer le bruit de fond) était toxique à long terme pour les neurones.

Nous avons enfin essayé d'infecter les neurones par coculture avec des cellules Vero rBDV-P-TCT préalablement marquées avec le réactif ReAsH. Pour ces

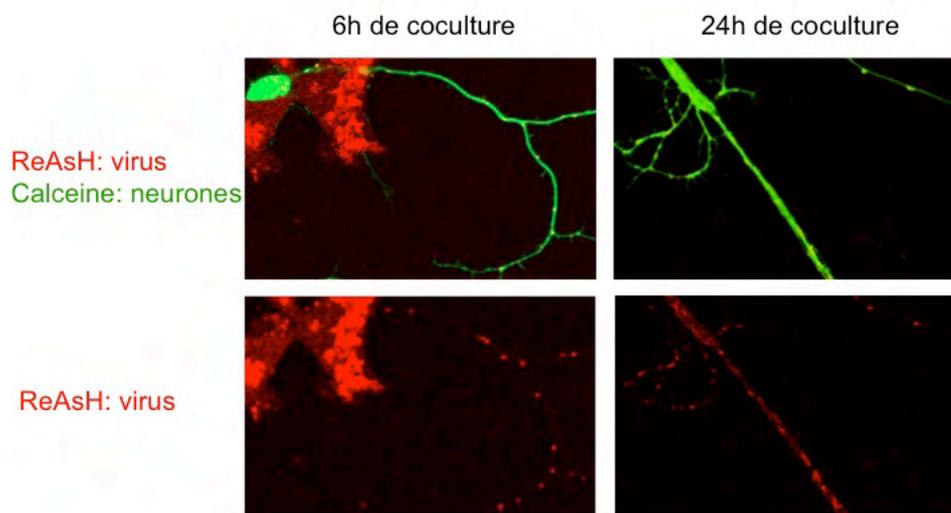


Figure 30: Coculture entre les cellules Vero rBDV-P-Flag-TCT et les neurones corticaux.

expériences, les neurones ont été marqués à la calcéine (marquage vert) afin d'identifier clairement les prolongements cellulaires (axones et dendrites) (Figure 30). Le transfert de BDV fluorescent (rouge) a été visualisé dans les neurones au bout de 8h, ce signal semblant être amplifié après 24h de coculture (Figure 30). Cependant ces expériences étaient peu reproductibles et n'ont pu être répétées de façon fiable.

En conclusion, malgré divers essais, il ne nous a pas été possible d'utiliser le virus rBDV-P-Flag-TCT pour étudier les modalités de son transport axonal dans les neurones.

Ces résultats nous ont conduit à aborder d'autres approches pour analyser les modalités du transport axonal du BDV, en particulier à tester l'hypothèse selon laquelle il serait transporté par les endosomes axonaux. Nos résultats d'immunofluorescence démontrant la colocalisation des protéines N et P avec le fragment Hc de TeNT nous donnent un premier argument en faveur de cette hypothèse et ces résultats ont été confirmés par les expériences d'immunoprécipitation et de tri des endosomes axonaux. Les protéines N et P étant les principaux composants de la RNP, nous pouvons conclure que les RNP sont transportées dans les endosomes axonaux. Il faudra cependant rechercher la présence de l'ARN génomique viral et déterminer si le virus est transporté sous forme enveloppée ou de RNP.

Nous espérons que les fractions triées par cytométrie en flux à l'aide du fragment Hc fluorescent contiennent uniquement des endosomes axonaux. Lorsque notre protocole sera complètement validé nous rechercherons alors la présence éventuelle de toutes les protéines virales, ainsi que celle de l'ARN génomique. Il sera notamment important de déterminer si la G est présente dans ces endosomes. Dans le cas contraire, nous disposerions d'un argument supplémentaire suggérant que le virus est transporté sous forme de RNP. A l'inverse, si la G est retrouvée dans les endosomes axonaux, nous pourrions supposer que le virus est transporté sous forme enveloppée. Il faudra cependant déterminer si la G se trouve dans les mêmes endosomes que la RNP, soit après analyse de ces fractions par microscopie électronique, soit par analyse en cytométrie en flux. Pour la cytométrie en flux, les extraits neuronaux seront marqués avec la TeNT pour identifier les endosomes axonaux, combiné à un marquage des diverses protéines virales. Cette approche requiert néanmoins de développer une approche de marquage intra-endosomal pour

les protéines pour lesquelles nous disposons de bons anticorps (N et P notamment). Par contre, comme nous ne possédons pas de bons anticorps reconnaissant la protéine G, il pourrait être nécessaire de transfecter les cellules infectées avec un plasmide codant pour la protéine G couplée à la GFP.

Ces données portant sur l'état du virus lorsqu'il est transporté dans les endosomes axonaux sont essentielles pour mieux comprendre les étapes d'entrée du BDV dans les neurones. En effet, dans le cas où le BDV serait transporté sous sa forme enveloppée, nous pouvons supposer que comme pour le CAV-2, le poliovirus, la TeNT ou encore le BDNF, il serait internalisé et transporté avec son récepteur dans les endosomes axonaux. Les études menées par l'équipe de Giampietro Schiavo portant sur l'identification des protéines présentes dans les endosomes axonaux par spectrométrie de masse, associées aux travaux portant sur l'étude des facteurs essentiels à l'entrée du BDV (Clemente, Sisman et al. 2010) pourraient alors nous aider à identifier le récepteur du BDV. A l'inverse, si le BDV est transporté sous forme de RNP, son récepteur n'est vraisemblablement pas présent dans les endosomes axonaux puisque ceci impliquerait une étape de libération des RNP dans le cytoplasme avant d'être pris en charge par les endosomes axonaux. Le mécanisme qui permettrait cette étape est actuellement complètement inconnu.

Par ailleurs, la contribution des facteurs nécessaires au transport des endosomes axonaux tels que les dynéines, les kinésines, les myosines ainsi que Rab5 et Rab7 pourrait être testée dans le cas du transport axonal du BDV grâce à l'utilisation de dominants négatifs ou d'inhibiteurs. Il serait aussi intéressant d'évaluer la valeur du pH à l'intérieur des endosomes axonaux. Tous ces paramètres ont déjà été étudiés pour les endosomes axonaux permettant de transporter la TeNT. Cependant, ces études ont été réalisées dans des neurones moteurs. Il serait donc intéressant de les effectuer dans les neurones d'hippocampe ou de cortex et de comparer les résultats. Ces études nous permettraient de savoir si les modalités du transport axonal diffèrent en fonction du type de neurone étudié. Le rBDV-P-Flag-TCT n'étant pas utilisable, il est pour l'instant impossible de réaliser ces expériences par imagerie en temps réel. Il faudrait donc infecter les neurones lors de leur mise en culture et inhiber les moteurs du cytosquelette lors de la phase exponentielle d'infection, afin d'analyser ensuite l'effet de ces inhibiteurs sur la cinétique de dissémination virale. En réalisant ces mêmes expériences sur des cultures en

chambres microfluidiques, nous pourrions analyser séparément les effets des inhibiteurs sur le transport antérograde et rétrograde, en fonction du site d'infection.

Enfin, notre équipe a produit et caractérisé un virus recombinant comportant des mutations abolissant la capacité de la protéine P à être phosphorylée par la PKC, appelé rBDV-P_{AA}. De façon intéressante, ce virus est fortement atténué dans sa capacité à disséminer dans le cerveau (ou entre neurones), suggérant que la phosphorylation de la P est importante pour le transport efficace ou pour le passage du virus d'une cellule à une autre (Prat, Schmid et al. 2009; Schmid, Metz et al. 2010). De plus, certaines études ont montré que l'activation de la PKC inhibe le transport rétrograde des neutrophines dans la souris (Ozsarac, Weible et al. 2003). Il est donc possible que la phosphorylation dépendant de la PKC pourrait jouer un rôle dans le transport axonal du BDV. Comme nous possédons aussi le virus rBDV-P_{AA}-Flag-TCT, nous pourrions analyser les modalités de son transport en cellules Vero et les comparer à celles du virus sauvage. Il ne sera malheureusement pas possible de poursuivre cette étude dans des cultures de neurones, à cause des limitations techniques exposées ci dessus. Il est clair que l'obtention de virus recombinants (sous forme sauvage ou mutée) dont une des protéines de la RNP serait couplée à une GFP ou une Split-GFP représenterait une avancée considérable, permettant d'analyser la directionnalité du transport de ces virus par imagerie en temps réel. La vitesse de transport du virus ainsi que les paramètres influençant cette vitesse, comme l'impact de l'activité électrique des neurones, pourraient aussi être étudiés.

III- Conclusions

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de développer des approches technologiques novatrices permettant l'analyse des modalités du transport intracellulaire du BDV. Malgré les difficultés inhérentes à la biologie du BDV et au tag TCT, nous avons réussi à marquer une des protéines de la RNP de façon fluorescente. Grâce à cet outil, nous avons pu étudier précisément la dynamique de la P dans les différents compartiments cellulaires et visualiser pour la première fois le trafic intracellulaire du BDV dans des cellules Vero. Malheureusement, cet outil n'a pas pu être utilisé pour étudier le transport axonal du BDV. Nous avons donc mis en place des techniques originales et innovantes de purification des endosomes axonaux par immunoprécipitation et par tri par cytométrie en flux. Ces travaux nous ont permis d'identifier par quel moyen le BDV est transporté dans les axones. En conclusion, l'ensemble de mon travail ouvre la voie à une meilleure caractérisation du cycle cellulaire du BDV, ainsi que des facteurs impliqués dans son transport et sa dissémination neuronale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achmet Imam Chasan, M. B., Christian Kurts, and Sven Burgdorf (2013). Isolation of a specialized, antigen-loaded early endosomal subpopulation by flow cytometry. *Methods in molecular biology*. P. v. Endert. **960**: 379-388.
- Ackermann, A., P. Staeheli and U. Schneider (2007). "Adaptation of Borna disease virus to new host species attributed to altered regulation of viral polymerase activity." *J Virol* **81**(15): 7933-7940.
- Apodaca, G. (2001). "Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton." *Traffic* **2**(3): 149-159.
- Arhel, N., A. Genovesio, K. A. Kim, S. Miko, E. Perret, J. C. Olivo-Marin, S. Shorte and P. Charneau (2006). "Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes." *Nat Methods* **3**(10): 817-824.
- Avilov, S. V., D. Moisy, S. Munier, O. Schraidt, N. Naffakh and S. Cusack (2012). "Replication-competent influenza A virus that encodes a split-green fluorescent protein-tagged PB2 polymerase subunit allows live-cell imaging of the virus life cycle." *J Virol* **86**(3): 1433-1448.
- Bajramovic, J. J., S. Mütter, S. Syan, U. Nerhbass, M. Brahic and D. Gonzalez-Dunia (2003). "Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in neurons." *J. Virol.* **77**(22): 12222-12231.
- Bearer, E. L. and T. S. Reese (1999). "Association of actin filaments with axonal microtubule tracts." *Journal of Neurocytology* **28**(2): 85-98.
- Bittins, C. M., T. W. Eichler, J. A. Hammer, 3rd and H. H. Gerdes (2010). "Dominant-negative myosin Va impairs retrograde but not anterograde axonal transport of large dense core vesicles." *Cellular and Molecular Neurobiology* **30**(3): 369-379.
- Bohnert, S. and G. Schiavo (2005). "Tetanus toxin is transported in a novel neuronal compartment characterized by a specialized pH regulation." *J Biol Chem* **280**(51): 42336-42344.
- Bridgman, P. C. (2004). "Myosin-dependent transport in neurons." *Journal of Neurobiology* **58**(2): 164-174.
- Briese, T., A. Schneemann, A. J. Lewis, Y. S. Park, S. Kim, H. Ludwig and W. I. Lipkin (1994). "Genomic organization of Borna disease virus." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(10): 4362-4366.
- Burkhardt, J. K., C. J. Echeverri, T. Nilsson and R. B. Vallee (1997). "Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution." *Journal of Cell Biology* **139**(2): 469-484.
- Ceccaldi, P. E., J. P. Gillet and H. Tsiang (1989). "Inhibition of the transport of rabies virus in the central nervous system." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **48**(6): 620-630.
- Ch'ng, T. H. and L. W. Enquist (2005). "Efficient axonal localization of alphaherpesvirus structural proteins in cultured sympathetic neurons requires viral glycoprotein E." *J Virol* **79**(14): 8835-8846.
- Chalmers, R. M., D. R. Thomas and R. L. Salmon (2005). "Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review." *Qjm* **98**(4): 255-274.

- Charlton, K. M., S. Nadin-Davis, G. A. Casey and A. I. Wandeler (1997). "The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure." *Acta Neuropathologica* **94**(1): 73-77.
- Clemente, R. and J. C. de la Torre (2007). "Cell-to-cell spread of Borna disease virus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein." *J Virol* **81**(11): 5968-5977.
- Clemente, R. and J. C. de la Torre (2009). "Cell entry of Borna disease virus follows a clathrin-mediated endocytosis pathway that requires Rab5 and microtubules." *J Virol* **83**(20): 10406-10416.
- Clemente, R., E. Sisman, P. Aza-Blanc and J. C. de la Torre (2010). "Identification of host factors involved in borna disease virus cell entry through a small interfering RNA functional genetic screen." *J Virol* **84**(7): 3562-3575.
- Cubitt, B. and J. C. de la Torre (1994). "Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present." *J. Virol.* **68**(3): 1371-1381.
- Cudmore, S., P. Cossart, G. Griffiths and M. Way (1995). "Actin-based motility of vaccinia virus." *Nature* **378**(6557): 636-638.
- Daito, T., K. Fujino, T. Honda, Y. Matsumoto, Y. Watanabe and K. Tomonaga (2011). "A novel borna disease virus vector system that stably expresses foreign proteins from an intercistronic noncoding region." *J Virol* **85**(23): 12170-12178.
- Das, S. C., D. Panda, D. Nayak and A. K. Pattnaik (2009). "Biarsenical labeling of vesicular stomatitis virus encoding tetracysteine-tagged m protein allows dynamic imaging of m protein and virus uncoating in infected cells." *J Virol* **83**(6): 2611-2622.
- Dauphin, G., V. Legay, P. H. Pitel and S. Zientara (2002). "Borna disease: current knowledge and virus detection in France." *Vet Res* **33**(2): 127-138.
- de la Torre, J. C., L. Bode, R. Dürrwald, B. Cubitt and H. Ludwig (1996). "Sequence characterization of human Borna disease virus." *Virus Res.* **44**(1): 33-44.
- de la Torre, J. C., D. Gonzalez-Dunia, B. Cubitt, M. Mallory, N. Mueller-Lantsch, F. A. Grässer, L. A. Hansen and E. Masliah (1996). "Detection of Borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients." *Virology* **223**: 272-282.
- Deacon, S. W., A. S. Serpinskaya, P. S. Vaughan, M. Lopez Fanarraga, I. Vernos, K. T. Vaughan and V. I. Gelfand (2003). "Dynactin is required for bidirectional organelle transport." *Journal of Cell Biology* **160**(3): 297-301.
- Deinhardt, K., O. Berninghausen, H. J. Willison, C. R. Hopkins and G. Schiavo (2006). "Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1." *Journal of Cell Biology* **174**(3): 459-471.
- Deinhardt, K., S. Salinas, C. Verastegui, R. Watson, D. Worth, S. Hanrahan, C. Bucci and G. Schiavo (2006). "Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway." *Neuron* **52**(2): 293-305.
- del Rio, T., T. H. Ch'ng, E. A. Flood, S. P. Gross and L. W. Enquist (2005). "Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies." *J Virol* **79**(7): 3903-3919.
- Delcroix, J. D., J. S. Valletta, C. Wu, S. J. Hunt, A. S. Kowal and W. C. Mobley (2003). "NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals." *Neuron* **39**(1): 69-84.

- Dohner, K., A. Wolfstein, U. Prank, C. Echeverri, D. Dujardin, R. Vallee and B. Sodeik (2002). "Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport." *Molecular Biology of the Cell* **13**(8): 2795-2809.
- Echeverri, C. J., B. M. Paschal, K. T. Vaughan and R. B. Vallee (1996). "Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis." *Journal of Cell Biology* **132**(4): 617-633.
- Encalada, S. E., L. Szpankowski, C. H. Xia and L. S. Goldstein (2011). "Stable kinesin and dynein assemblies drive the axonal transport of mammalian prion protein vesicles." *Cell* **144**(4): 551-565.
- Finke, S. and K. K. Conzelmann (2005). "Replication strategies of rabies virus." *Virus Research* **111**(2): 120-131.
- Formella, S., C. Jehle, C. Sauder, P. Staeheli and M. Schwemmle (2000). "Sequence variability of Borna disease virus: resistance to superinfection may contribute to high genome stability in persistently infected cells." *J Virol* **74**(17): 7878-7883.
- Garner, J. A. (2003). "Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells." *Adv Drug Deliv Rev* **55**(11): 1497-1513.
- Gaudin, Y., R. W. Ruigrok, M. Knossow and A. Flamand (1993). "Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion." *J Virol* **67**(3): 1365-1372.
- Geib, T., C. Sauder, S. Venturelli, C. Hassler, P. Staeheli and M. Schwemmle (2003). "Selective virus resistance conferred by expression of Borna disease virus nucleocapsid components." *J Virol* **77**(7): 4283-4290.
- Goldstein, L. S. and Z. Yang (2000). "Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins." *Annual Review of Neuroscience* **23**: 39-71.
- Gonzalez-Dunia, D., B. Cubitt and J. C. de la Torre (1998). "Mechanism of Borna disease virus entry into cells." *J. Virol.* **72**(1): 783-788.
- Gonzalez-Dunia, D., B. Cubitt, F. A. Grässer and J. C. de la Torre (1997). "Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry." *J. Virol.* **71**(4): 3208-3218.
- Gousset, K., S. D. Ablan, L. V. Coren, A. Ono, F. Soheilian, K. Nagashima, D. E. Ott and E. O. Freed (2008). "Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages." *Plos Pathog* **4**(3): e1000015.
- Griffin, B. A., S. R. Adams and R. Y. Tsien (1998). "Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells." *Science* **281**(5374): 269-272.
- Gross, S. P. (2004). "Hither and yon: a review of bi-directional microtubule-based transport." *Phys Biol* **1**(1-2): R1-11.
- Habjan, M., I. Andersson, J. Klingstrom, M. Schumann, A. Martin, P. Zimmermann, V. Wagner, A. Pichlmair, U. Schneider, E. Muhlberger, A. Mirazimi and F. Weber (2008). "Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction." *PLoS ONE* **3**(4): e2032.
- Hafezparast, M., R. Klocke, C. Ruhrberg, A. Marquardt, A. Ahmad-Annuar, S. Bowen, G. Lalli, A. S. Witherden, H. Hummerich, S. Nicholson, P. J. Morgan, R. Oozageer, J. V. Priestley, S. Averill, V. R. King, S. Ball, J. Peters, T. Toda, A. Yamamoto, Y. Hiraoka, M. Augustin, D. Korthaus, S. Wattler, P. Wabnitz, C. Dickneite, S. Lampel, F. Boehme, G. Peraus, A. Popp, M. Rudelius, J. Schlegel, H. Fuchs, M. Hrabe de Angelis, G. Schiavo, D. T. Shima, A. P.

- Russ, G. Stumm, J. E. Martin and E. M. Fisher (2003). "Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport." Science **300**(5620): 808-812.
- Hagiwara, K., Y. Tsuge, M. Asakawa, H. Kabaya, M. Okamoto, T. Miyasho, H. Taniyama, C. Ishihara, J. C. de la Torre and K. Ikuta (2008). "Borna disease virus RNA detected in Japanese macaques (*Macaca fuscata*)." Primates **49**(1): 57-64.
- Hammer, J. A., 3rd and J. R. Sellers (2012). "Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(1): 13-26.
- Herreros, J., T. Ng and G. Schiavo (2001). "Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons." Molecular Biology of the Cell **12**(10): 2947-2960.
- Hirokawa, N., S. Niwa and Y. Tanaka (2010). "Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease." Neuron **68**(4): 610-638.
- Holland, D. J., M. Miranda-Saksena, R. A. Boadle, P. Armati and A. L. Cunningham (1999). "Anterograde transport of herpes simplex virus proteins in axons of peripheral human fetal neurons: an immunoelectron microscopy study." J Virol **73**(10): 8503-8511.
- Horie, M., T. Honda, Y. Suzuki, Y. Kobayashi, T. Daito, T. Oshida, K. Ikuta, P. Jern, T. Gojobori, J. M. Coffin and K. Tomonaga (2010). "Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes." Nature **463**(7277): 84-87.
- Huang, J., H. M. Lazear and H. M. Friedman (2011). "Completely assembled virus particles detected by transmission electron microscopy in proximal and mid-axons of neurons infected with herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and pseudorabies virus." Virology **409**(1): 12-16.
- Ibiricu, I., J. T. Huiskonen, K. Dohner, F. Bradke, B. Sodeik and K. Grunewald (2011). "Cryo electron tomography of herpes simplex virus during axonal transport and secondary envelopment in primary neurons." Plos Pathog **7**(12): e1002406.
- Jackson, A. C. (1994). "Animal models of rabies virus neurovirulence." Current Topics in Microbiology and Immunology **187**: 85-93.
- Jacob, Y., H. Badrane, P. E. Ceccaldi and N. Tordo (2000). "Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein." J Virol **74**(21): 10217-10222.
- Karki, S. and E. L. Holzbaur (1995). "Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex." J Biol Chem **270**(48): 28806-28811.
- Kilinc, D., J. M. Peyrin, V. Soubeyre, S. Magnifico, L. Saias, J. L. Viovy and B. Brugg (2010). "Wallerian-Like Degeneration of Central Neurons After Synchronized and Geometrically Registered Mass Axotomy in a Three-Compartmental Microfluidic Chip." Neurotox Res.
- King, S. J. and T. A. Schroer (2000). "Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor." Nat Cell Biol **2**(1): 20-24.
- Kinnunen, P. M., C. Billich, C. Ek-Kommonen, H. Henttonen, R. K. Kallio, J. Niemimaa, A. Palva, P. Staeheli, A. Vaheri and O. Vapalahti (2007). "Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland." J Clin Virol **38**(1): 64-69.
- Klingen, Y., K. K. Conzelmann and S. Finke (2008). "Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport." J Virol **82**(1): 237-245.

- Knipe, D. M. and A. Cliffe (2008). "Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection." *Nat Rev Microbiol* **6**(3): 211-221.
- Kobayashi, T., G. Zhang, B. J. Lee, S. Baba, M. Yamashita, W. Kamitani, H. Yanai, K. Tomonaga and K. Ikuta (2003). "Modulation of Borna disease virus phosphoprotein nuclear localization by the viral protein X encoded in the overlapping open reading frame." *J Virol* **77**(14): 8099-8107.
- Kraus, I., E. Bogner, H. Lilie, M. Eickmann and W. Garten (2005). "Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus." *FEBS Letters* **579**(12): 2686-2692.
- Kumar, S., I. H. Lee and M. Plamann (2000). "Cytoplasmic dynein ATPase activity is regulated by dynactin-dependent phosphorylation." *J Biol Chem* **275**(41): 31798-31804.
- Lahaye, X., A. Vidy, C. Pomier, L. Obiang, F. Harper, Y. Gaudin and D. Blondel (2009). "Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication." *J Virol* **83**(16): 7948-7958.
- Lakadamyali, M., M. J. Rust, H. P. Babcock and X. Zhuang (2003). "Visualizing infection of individual influenza viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9280-9285.
- Lalli, G., S. Bohnert, K. Deinhardt, C. Verastegui and G. Schiavo (2003). "The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons." *Trends in Microbiology* **11**(9): 431-437.
- Lalli, G., S. Gschmeissner and G. Schiavo (2003). "Myosin Va and microtubule-based motors are required for fast axonal retrograde transport of tetanus toxin in motor neurons." *Journal of Cell Science* **116**(Pt 22): 4639-4650.
- Lalli, G. and G. Schiavo (2002). "Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR." *Journal of Cell Biology* **156**(2): 233-239.
- Lentz, T. L., T. G. Burrage, A. L. Smith and G. H. Tignor (1983). "The acetylcholine receptor as a cellular receptor for rabies virus." *Yale Journal of Biology and Medicine* **56**(4): 315-322.
- Li, Y., X. Lu, J. Li, N. Berube, K. L. Giest, Q. Liu, D. H. Anderson and Y. Zhou (2010). "Genetically engineered, biarsenically labeled influenza virus allows visualization of viral NS1 protein in living cells." *J Virol* **84**(14): 7204-7213.
- Ludwig, H. and L. Bode (2000). "Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology." *Rev Sci Tech* **19**(1): 259-288.
- Matsumoto, Y., Y. Hayashi, H. Omori, T. Honda, T. Daito, M. Horie, K. Ikuta, K. Fujino, S. Nakamura, U. Schneider, G. Chase, T. Yoshimori, M. Schwemmler and K. Tomonaga (2012). "Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection." *Cell Host Microbe* **11**(5): 492-503.
- Mebatsion, T. (2001). "Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein." *J Virol* **75**(23): 11496-11502.
- Mire, C. E., D. Dube, S. E. Delos, J. M. White and M. A. Whitt (2009). "Glycoprotein-dependent acidification of vesicular stomatitis virus enhances release of matrix protein." *J Virol* **83**(23): 12139-12150.
- Mitchell, D. J., K. R. Blasier, E. D. Jeffery, M. W. Ross, A. K. Pullikuth, D. Suo, J. Park, W. R. Smiley, K. W. Lo, J. Shabanowitz, C. D. Deppmann, J. C.

- Trinidad, D. F. Hunt, A. D. Catling and K. K. Pfister (2012). "Trk activation of the ERK1/2 kinase pathway stimulates intermediate chain phosphorylation and recruits cytoplasmic dynein to signaling endosomes for retrograde axonal transport." *J Neurosci* **32**(44): 15495-15510.
- Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* **312**(5991): 237-242.
- Moisy, D., S. V. Avilov, Y. Jacob, B. M. Laoide, X. Ge, F. Baudin, N. Naffakh and J. L. Jestin (2012). "HMGB1 protein binds to influenza virus nucleoprotein and promotes viral replication." *J Virol* **86**(17): 9122-9133.
- Negatsch, A., H. Granzow, C. Maresch, B. G. Klupp, W. Fuchs, J. P. Teifke and T. C. Mettenleiter (2010). "Ultrastructural analysis of virion formation and intraaxonal transport of herpes simplex virus type 1 in primary rat neurons." *J Virol* **84**(24): 13031-13035.
- Neumann, P., D. Lieber, S. Meyer, P. Dautel, A. Kerth, I. Kraus, W. Garten and M. T. Stubbs (2009). "Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein (BDV-M) reveals ssRNA binding properties." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(10): 3710-3715.
- Nielsen, E., F. Severin, J. M. Backer, A. A. Hyman and M. Zerial (1999). "Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules." *Nat Cell Biol* **1**(6): 376-382.
- Ohka, S., M. Sakai, S. Bohnert, H. Igarashi, K. Deinhardt, G. Schiavo and A. Nomoto (2009). "Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons." *J Virol* **83**(10): 4995-5004.
- Okamoto, M., K. Hagiwara, W. Kamitani, T. Sako, K. Hirayama, R. Kirisawa, M. Tsuji, C. Ishihara, H. Iwai, T. Kobayashi, K. Tomonaga, K. Ikuta and H. Taniyama (2003). "Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse." *Arch Virol* **148**(8): 1557-1568.
- Ozsarac, N., M. Weible, 2nd, A. J. Reynolds and I. A. Hendry (2003). "Activation of protein kinase C inhibits retrograde transport of neurotrophins in mice." *Journal of Neuroscience Research* **72**(2): 203-210.
- Penfold, M. E., P. Armati and A. L. Cunningham (1994). "Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(14): 6529-6533.
- Perez, M. and J. C. de la Torre (2005). "Identification of the Borna disease virus (BDV) proteins required for the formation of BDV-like particles." *J Gen Virol* **86**(Pt 7): 1891-1895.
- Perez, M., A. Sanchez, B. Cubitt, D. Rosario and J. C. de la Torre (2003). "A reverse genetics system for Borna disease virus." *J Gen Virol* **84**(Pt 11): 3099-3104.
- Perez, M., M. Watanabe, M. A. Whitt and J. C. de La Torre (2001). "N-terminal domain of borna disease virus g (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry." *J Virol* **75**(15): 7078-7085.
- Phair, R. D. and T. Misteli (2000). "High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus." *Nature* **404**(6778): 604-609.
- Poenisch, M., N. Burger, P. Staeheli, G. Bauer and U. Schneider (2009). "Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats." *J Virol* **83**(9): 4297-4307.
- Poenisch, M., G. Unterstab, T. Wolff, P. Staeheli and U. Schneider (2004). "The X protein of Borna disease virus regulates viral polymerase activity through interaction with the P protein." *J Gen Virol* **85**(Pt 7): 1895-1898.

- Poulain, F. E. and A. Sobel (2010). "The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players." *Molecular and Cellular Neurosciences* **43**(1): 15-32.
- Prat, C. M., S. Schmid, F. Farrugia, N. Cenac, G. Le Masson, M. Schwemmler and D. Gonzalez-Dunia (2009). "Mutation of the protein kinase C site in Borna disease virus phosphoprotein abrogates viral interference with neuronal signaling and restores normal synaptic activity." *PLoS Pathog* **5**(5): e1000425.
- Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal and J. Lippincott-Schwartz (1997). "ER-to-Golgi transport visualized in living cells." *Nature* **389**(6646): 81-85.
- Puls, I., C. Jonnakuty, B. H. LaMonte, E. L. Holzbaur, M. Tokito, E. Mann, M. K. Floeter, K. Bidus, D. Drayna, S. J. Oh, R. H. Brown, Jr., C. L. Ludlow and K. H. Fischbeck (2003). "Mutant dynactin in motor neuron disease." *Nature Genetics* **33**(4): 455-456.
- Qie, L., D. Marcellino and B. C. Herold (1999). "Herpes simplex virus entry is associated with tyrosine phosphorylation of cellular proteins." *Virology* **256**(2): 220-227.
- Rasalingam, P., J. P. Rossiter, T. Mebatsion and A. C. Jackson (2005). "Comparative pathogenesis of the SAD-L16 strain of rabies virus and a mutant modifying the dynein light chain binding site of the rabies virus phosphoprotein in young mice." *Virus Research* **111**(1): 55-60.
- Raux, H., A. Flamand and D. Blondel (2000). "Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain." *J Virol* **74**(21): 10212-10216.
- Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis and M. Zerial (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." *Cell* **122**(5): 735-749.
- Rose, A. and C. Schlieker (2012). "Alternative nuclear transport for cellular protein quality control." *Trends Cell Biol* **22**(10): 509-514.
- Ross, J. L., M. Y. Ali and D. M. Warshaw (2008). "Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton." *Current Opinion in Cell Biology* **20**(1): 41-47.
- Salinas, S., L. G. Bilisland, D. Henaff, A. E. Weston, A. Keriell, G. Schiavo and E. J. Kremer (2009). "CAR-associated vesicular transport of an adenovirus in motor neuron axons." *Plos Pathog* **5**(5): e1000442.
- Salinas, S., L. G. Bilisland and G. Schiavo (2008). "Molecular landmarks along the axonal route: axonal transport in health and disease." *Current Opinion in Cell Biology* **20**(4): 445-453.
- Salinas, S., G. Schiavo and E. J. Kremer (2010). "A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins." *Nat Rev Microbiol* **8**(9): 645-655.
- Sauder, C. and P. Staeheli (2003). "Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications." *J Virol* **77**(23): 12886-12890.
- Schliwa, M. and G. Woehlke (2003). "Molecular motors." *Nature* **422**(6933): 759-765.
- Schmid, S., D. Mayer, U. Schneider and M. Schwemmler (2007). "Functional characterization of the major and minor phosphorylation sites of the P protein of Borna disease virus." *J Virol* **81**(11): 5497-5507.
- Schmid, S., P. Metz, C. M. Prat, D. Gonzalez-Dunia and M. Schwemmler (2010). "Protein kinase C-dependent phosphorylation of Borna disease virus P protein is required for efficient viral spread." *Arch Virol* **155**(5): 789-793.

- Schneider, U. (2005). "Novel insights into the regulation of the viral polymerase complex of neurotropic Borna disease virus." *Virus Res* **111**(2): 148-160.
- Schneider, U., A. Ackermann and P. Staeheli (2007). "A Borna disease virus vector for expression of foreign genes in neurons of rodents." *J Virol* **81**(13): 7293-7296.
- Schneider, U., K. Blechschmidt, M. Schwemmle and P. Staeheli (2004). "Overlap of interaction domains indicates a central role of the P protein in assembly and regulation of the Borna disease virus polymerase complex." *J Biol Chem* **279**(53): 55290-55296.
- Schneider, U., M. Naegele, P. Staeheli and M. Schwemmle (2003). "Active Borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein." *J Virol* **77**(21): 11781-11789.
- Schneider, U., M. Schwemmle and P. Staeheli (2005). "Genome trimming: a unique strategy for replication control employed by Borna disease virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(9): 3441-3446.
- Schnell, M. J., J. P. McGettigan, C. Wirblich and A. Papaneri (2010). "The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain." *Nat Rev Microbiol* **8**(1): 51-61.
- Schroer, T. A. (2004). "Dynactin." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 759-779.
- Schwemmle, M., B. De, L. C. Shi, A. Banerjee and W. I. Lipkin (1997). "Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase c-epsilon and casein kinase II." *J. Biol. Chem.* **272**(35): 21818-21823.
- Snyder, A., B. Bruun, H. M. Browne and D. C. Johnson (2007). "A herpes simplex virus gD-YFP fusion glycoprotein is transported separately from viral capsids in neuronal axons." *J Virol* **81**(15): 8337-8340.
- Snyder, A., K. Polcicova and D. C. Johnson (2008). "Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons." *J Virol* **82**(21): 10613-10624.
- Snyder, A., T. W. Wisner and D. C. Johnson (2006). "Herpes simplex virus capsids are transported in neuronal axons without an envelope containing the viral glycoproteins." *J Virol* **80**(22): 11165-11177.
- Sodeik, B. (2000). "Mechanisms of viral transport in the cytoplasm." *Trends in Microbiology* **8**(10): 465-472.
- Suberbielle, E., A. Stella, F. Pont, C. Monnet, E. Mouton, L. Lamouroux, B. Monsarrat and D. Gonzalez-Dunia (2008). "Proteomic analysis reveals selective impediment of neuronal remodeling upon Borna disease virus infection." *J Virol* **82**(24): 12265-12279.
- Suomalainen, M., M. Y. Nakano, S. Keller, K. Boucke, R. P. Stidwill and U. F. Greber (1999). "Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus." *Journal of Cell Biology* **144**(4): 657-672.
- Tan, G. S., M. A. Preuss, J. C. Williams and M. J. Schnell (2007). "The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(17): 7229-7234.
- Thoulouze, M. I., M. Lafage, M. Schachner, U. Hartmann, H. Cremer and M. Lafon (1998). "The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus." *J Virol* **72**(9): 7181-7190.
- Tuffereau, C., J. Benejean, D. Blondel, B. Kieffer and A. Flamand (1998). "Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus." *Embo J* **17**(24): 7250-7259.

- Unterstab, G., S. Ludwig, A. Anton, O. Planz, B. Dauber, D. Krappmann, G. Heins, C. Ehrhardt and T. Wolff (2005). "Viral targeting of the interferon- β -inducing Traf family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(38): 13640-13645.
- Valetti, C., D. M. Wetzel, M. Schrader, M. J. Hasbani, S. R. Gill, T. E. Kreis and T. A. Schroer (1999). "Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170." *Molecular Biology of the Cell* **10**(12): 4107-4120.
- Vaughan, K. T. and R. B. Vallee (1995). "Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued." *Journal of Cell Biology* **131**(6 Pt 1): 1507-1516.
- von Sind, J. B. (1767). "Der im Feld und auf der Reise geschwind heilende Pferdearzt, welcher einen gründlichen Unterricht von den gewöhnlichsten Krankheiten der Pferde im Feld und auf der Reise wie auch einen auserlesenen Vorrath der nützlichsten und durch die Erfahrung bewährtesten Heilmitteln eröffnet." Heinrich Ludwig Brönner, Frankfurt und Leipzig.
- Walczak, C. E. and R. Heald (2008). "Mechanisms of mitotic spindle assembly and function." *International Review of Cytology* **265**: 111-158.
- Watanabe, M., Q. Zhong, T. Kobayashi, W. Kamitani, K. Tomonaga and K. Ikuta (2000). "Molecular ratio between borna disease viral-p40 and -p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA [In Process Citation]." *Microbiol Immunol* **44**(9): 765-772.
- Wegner, A. (1976). "Head to tail polymerization of actin." *Journal of Molecular Biology* **108**(1): 139-150.
- Wehrle-Haller, B. and B. A. Imhof (2003). "Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **35**(1): 39-50.
- Welte, M. A. (2004). "Bidirectional transport along microtubules." *Current Biology* **14**(13): R525-537.
- Wiedemann, F. R., D. Siemen, C. Mawrin, T. F. Horn and K. Dietzmann (2006). "The neurotrophin receptor TrkB is colocalized to mitochondrial membranes." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **38**(4): 610-620.
- Wisner, T. W., K. Sugimoto, P. W. Howard, Y. Kawaguchi and D. C. Johnson (2011). "Anterograde transport of herpes simplex virus capsids in neurons by both separate and married mechanisms." *J Virol* **85**(12): 5919-5928.
- Wittels, M. and P. G. Spear (1991). "Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway." *Virus Research* **18**(2-3): 271-290.
- Woldehiwet, Z. (2002). "Rabies: recent developments." *Research in Veterinary Science* **73**(1): 17-25.
- Wu, Y. J., H. Schulz, C. C. Lin, K. Saar, G. Patone, H. Fischer, N. Hubner, B. Heimrich and M. Schwemmle (2013). "Borna disease virus-induced neuronal degeneration dependent on host genetic background and prevented by soluble factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(5): 1899-1904.
- Zala, D., M. V. Hinckelmann, H. Yu, M. M. Lyra da Cunha, G. Liot, F. P. Cordelieres, S. Marco and F. Saudou (2013). "Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport." *Cell* **152**(3): 479-491.
- Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 107-117.

Zhou, B., Q. Cai, Y. Xie and Z. H. Sheng (2012). "Snapin recruits dynein to BDNF-TrkB signaling endosomes for retrograde axonal transport and is essential for dendrite growth of cortical neurons." Cell Rep **2**(1): 42-51.

TITLE :

5 B5 @MG-C: '6 CFB5 J-FI G-BHF579 @@ @ F'HF5 BGDCFH

Abstract :

Borna disease virus (BDV) is a neurotropic virus that establishes long-term persistence in the central nervous system. The cellular cycle of BDV remains poorly understood, in particular concerning the modalities of intracellular transport of viral ribonucleoproteins (RNP). During my Ph.D., I developed several approaches aiming at a better understanding of the modalities of BDV transport. To track RNP transport in live, infected cells, we constructed a recombinant virus that can be fluorescently labeled. We analyzed viral dynamics in persistently and newly infected cells using live imaging. We also studied the molecular mechanisms of BDV transport in primary cultures of neurons and we demonstrated that RNP are transported by axonal endosomes.



AUTEUR : 7 Ufc`]bY7 <5 F @9F

TITRE : 5 bUmgY`Xi `hfUbgdcfh]bhfUW`i `Ujfy`Xi `6 cfbUj]fi g

DIRECTEUR DE THESE : Docteur Daniel Duniaž8 cWfi f`7 fWj`YA Ubc

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : % `gYdhYa VfY`&\$%, Toulouse

RESUME :

Le Bornavirus (BDV) est un virus neurotrope qui persiste dans le système nerveux central. Son cycle viral est mal caractérisé, en particulier en ce qui concerne les modalités du transport intracellulaire des complexes de réplication viraux (RNP). Afin de visualiser le transport des RNP, nous avons construit un virus recombinant pouvant être marqué de façon fluorescente. L'observation de ce virus par différentes techniques d'imagerie en temps réel nous a permis d'étudier la dynamique des RNP durant les phases précoces de l'infection, ainsi que dans des cellules infectées de façon persistante. Nous avons ensuite étudié les modalités du transport du BDV dans les neurones et nous avons montré que les RNP étaient transportées par les endosomes axonaux. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour une meilleure caractérisation de la biologie du BDV.

MOTS-CLES

Bornavirus, cycle viral, imagerie, neurone, transport axonal

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Microbiologie - Virologie

INSERM UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

Equipe 9 : Pathogénie des infections virales du système nerveux central

Bâtiment B. 4^{ème} étage

CHU Purpan – BP 3028

31024 Toulouse Cedex 3

France