

Interactions virus-cellule - session I

Entrée

Judi 22 mars 2018, 14 h 00-15 h 15

Moderateurs : Bruno Blondel & Mabel Thoulouze

Communications orales O1 à O5

Affiches P1 à P29, P81, P82, P95, P96

O1

Ephrin receptor protein: a receptor of a plant polerovirus in its aphid vector

Sylvaine Boissinot¹, Michael Mulot, Baptiste Monsion, Maryam Rastegar, Aurélie Marmonier, Sophie Meyer, Nicole Bochet, Véronique Brault

¹ INRA, Université de Strasbourg, SVQV UMR-A 1131, 68021, Colmar, France (INRA Colmar, UMR SVQV, Équipe virologie-vection), Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR1131, INRA-UMR SVQV-Équipe Vive -28 rue de Herrlisheim 68000 Colmar, France <sylvaine.boissinot@inra.fr>

Aphid-transmitted plant viruses are a threat for major crops causing massive economic loss worldwide. Since most phytoviruses are transmitted from plant to plant by vectors, chemical treatments are applied to reduce vector populations and to limit virus impact. Nevertheless, these methods are damageable for the environment and human health, and it is crucial to elaborate alternative strategies to reduce virus transmission by vectors. Members in the *Luteoviridae* family are transmitted by aphids in a circulative and non-replicative mode. Virions are acquired by aphids when ingesting sap from infected plants and are transported through the gut and the accessory salivary gland cells by a transcytosis mechanism relying on virus-specific receptors largely unknown. Once released into the salivary canal, virions are inoculated to plants, together with saliva, during a subsequent feeding. Identification of these receptors could result in the development of innovative strategies to reduce virus transmission by aphids. In the laboratory, we bring *in vivo* evidence that the membrane-bound Ephrin receptor (Eph), involved in cell communication and endocytosis in mammalian cells, is a novel aphid protein involved in the transmission of the *Turnip yellows virus* (TuYV, *Polerovirus* genus, *Luteoviridae*) by *Myzus persicae*. Interestingly, ephrin receptors have also been shown to display receptor functions for mammalian viruses. The minor capsid protein of TuYV, essential for aphid transmission, was able to bind the external domain of Eph in yeast. Feeding *M. persicae* on *in planta*- or *in vitro*-synthesized dsRNA targeting Eph-mRNA (dsRNAEph) did not affect aphid feeding behavior but reduced accumulation of TuYV genomes in the aphid's body. Consequently, TuYV transmission efficiency by the dsRNAEph-treated aphids was reproducibly inhibited and we brought evidence that Eph is likely involved in intestinal uptake of the virion. The inhibition of virus uptake after dsRNAEph acquisition was also observed for two other poleroviruses transmitted by *M. persicae*, suggesting a broader role of Eph in polerovirus transmission. Finally, dsRNAEph acquisition by aphids did not affect larva production. Taken together, these experiments strongly suggest implication of Eph in polerovirus transmission. Whether Eph is a responsible for virus attachment at the cell surface or virus endocytosis still needs to be elucidated. These results pave the way towards a safe ecological alternative of insecticide treatments that are used to lower aphid populations and reduce polerovirus damages.

O2

Transmission du VIH-1 associée aux cellules à travers la muqueuse colorectale *ex vivo* et modulation par le liquide séminal

Julie Frouard¹, Giulia Matusali¹, Anne-Pascale Satie¹, Roxane Valentin¹, Laurent Sulpice², Célia Ravel^{1,3}, Nathalie Rioux-Leclercq^{1,4}, Anna Le Tortorec¹, Nathalie Dejuçq-Rainsford¹

¹ Institut de recherche, santé, environnement et travail [Rennes] (Irset), École nationale de la santé publique, Université de Rennes 1, Inserm U1085, Biosit, 9 avenue du professeur Léon Bernard 35000 Rennes cedex, France

² Centre hospitalier universitaire de Pontchaillou, Service de chirurgie hépatobiliaire et digestive, Rennes, France

³ Centre hospitalier universitaire de Pontchaillou, Laboratoire de biologie de la reproduction, CECOS, Rennes, France

⁴ Centre hospitalier universitaire de Pontchaillou, Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques, Rennes, France <julie.frouard@univ-rennes1.fr>

Contexte. Il a récemment été montré chez le macaque que l'inoculation intra-rectale de cellules infectées par le SIV est plus efficace que l'inoculation de virus libre pour initier une infection. A ce jour, la transmission par les cellules infectées (*cell-associated* (CA)) a été largement négligée, particulièrement au niveau de la muqueuse colorectale. Sachant que les mécanismes moléculaires de la transmission CA diffèrent de ceux impliqués dans la transmission par des virions, il est primordial de déterminer la contribution des cellules séminales à l'infection de la muqueuse colorectale et sa modulation par l'environnement séminal afin de développer des modèles pré-cliniques pertinents nécessaires au test de nouvelles approches de prévention vaccinales et non vaccinales efficaces contre l'ensemble des modes de transmission. Dans ce contexte nous avons cherché à déterminer les types de leucocytes impliqués dans l'infection CA de la muqueuse colorectale et l'impact du plasma séminal (SP). **Méthodes.** Un modèle *ex vivo* d'explant de colon humain polarisé ainsi qu'un modèle *in vitro* de cellules épithéliales du colon polarisées (Caco2) ont été développés. La face épithéliale apicale de ces modèles a été exposée soit à des lymphocytes T CD4+ ou PBMC, soit à des monocytes/macrophages (marqués CFSE), en présence ou en absence de 10 à 50 % de SP. L'intégrité de la barrière épithéliale avant et après exposition a été évaluée par mesure de la perméabilité (passage de dextran et mesure de la résistance trans-épithéliale), analyse histologique et marquage des molécules de jonction/adhésion. L'adhésion et la transmigration des leucocytes à travers l'épithélium colorectal ont été évaluées en microscopie en fluorescence. **Résultats.** La transmigration de lymphocytes T et de monocytes/macrophages a été observée à travers l'épithélium intact de la muqueuse du colon dès 1 h post exposition, en présence ou non de SP. Le SP ne modifie pas l'intégrité de la barrière, et n'impacte pas non plus le profil d'expression des molécules d'adhésion E-cadhérine et JAM-A. La présence de PBMC activés sous la barrière épithéliale augmente la transmigration de leucocytes, tout comme la présence de cytokines pro-inflammatoires TNF-alpha and IL-1bêta en apical. À l'inverse, le SP tend à diminuer le passage des monocytes et macrophages ainsi que leur adhésion à la barrière colorectale à la différence des lymphocytes, pour lesquels aucun impact majeur du SP n'a pu être mis en évidence. **Conclusions.** Il s'agit de la première démonstration de transmigration active et rapide de lymphocytes T et monocytes/macrophages à travers la barrière colorectale en présence de SP. Nos résultats suggèrent que ce dernier n'a pas d'effet sur l'intégrité de la barrière colorectale ni sur la capacité des lymphocytes à trans migrer à travers cette barrière, mais qu'à l'inverse il tend à diminuer l'adhésion et la transmigration des monocytes/macrophages.

O3

Mother-to-child transmission of Zika virus via breastfeeding : origin and transmission capacity of infectious particles in breast milk

Mathieu Hubert, Vincent Legros, Patricia Jeannin, Thomas Montange, Antoine Gessain^{1,2}, Pierre-Emmanuel Ceccaldi, Aurore Vidy-Roche

¹ Unité d'épidémiologie et de physiopathologie des virus oncogènes (EPVO), Département de virologie, Institut Pasteur, 75015 Paris, France,

² CNRS (UMR 3569), Institut Pasteur de Paris, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France

<antoine.gessain@pasteur.fr>

Zika virus (ZIKV) belongs to the *Flaviviridae* family and is part of the large panel of the arthropod-borne viruses (arboviruses). Discovered in Uganda

in 1947, ZIKV emerged in the Pacific islands at the end of the 2000s, essentially in Yap (2007) and French Polynesia (2013-14). Surprisingly, during the recent outbreak in Latin America in 2015-16, ZIKV was etiologically associated with a significant increase of birth defects (neurological disorders) in babies born from infected mothers. More than 50 persons were infected following a sexual intercourse. Due to the explosive incidence of ZIKV infection and the presence of viral particles, antigens, and/or genome in several body fluids, it was difficult to distinguish mosquito-borne and human-to-human transmission of the virus, depriving us of adequate preventive measures. Among those body fluids, breast milk of infected mothers contains a high viral load, whose maternal cellular origin and transmission capacity to the neonate's host are unknown. In the present study, we showed that cultured human mammary epithelial cells were permissive to ZIKV infection and produced infectious particles, suggesting that they could contribute to the amount of infectious particles in breast milk. Infectivity studies of ZIKV in presence of human breast milk are in progress. Due to its large mucosal surface, the gastrointestinal tract serves as entry site for numerous orally transmitted viruses and could permit mother-to-child ZIKV transmission following breastfeeding. Our results showed that intestinal epithelial cells were permissive to productive ZIKV infection, without undergoing cell death. By using an *in vitro* model of intestinal epithelium cultivated onto Transwell inserts, we demonstrated that ZIKV did not alter the integrity of the intestinal epithelium. As a consequence, basolateral viral production and/or transport of ZIKV through the intestinal epithelium could mediate ZIKV infection of the newborn. If current *in vivo* experiments confirm that mother-to-child transmission of ZIKV via breastfeeding is a plausible route of transmission, breastfeeding recommendations could be adapted for future ZIKV re-emergences.

O4

Vectorisation du système CRISPR CAS9 dans la cellule primaire et l'animal par pseudo-particules rétrovirales non codantes

Philippe E Mangeot¹, Valérie Risson², Floriane Fusil¹, Virginie Mournetas³, Emmanuelle Massouridès³, Aline Marnet⁴, Gaëlle Legube⁴, Christian Pinset³, François-Loïc Cosset¹, Els Verhoeven^{1,5}, Theophile Ohlmann¹, Emiliano Ricci¹

¹ Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), École normale supérieure Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm U1111, CNRS UMR5308, 21 avenue Tony Garnier 69365 Lyon cedex 07, France

² Institut NeuroMyogène (INMG), CNRS UMR5310, Centre de recherche Inserm, Université Claude Bernard-Lyon 1, France

³ Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques (I-STEM), Université d'Évry-Val-d'Essonne, Inserm U861, Généthon 1, rue de l'internationale BP 118 94004 Évry cedex, France

⁴ Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire du contrôle de la prolifération (LBCMCP), CNRS UMR5088, Université Paul Sabatier (UPS)-Toulouse III, Bât 4R3B1 118 route de Narbonne 31062 Toulouse cedex 4, France

⁵ Centre méditerranéen de médecine moléculaire (C3M), Inserm U1065, Université Nice Sophia Antipolis [UNS], Hôpital de l'Archet, 151 rue Saint Antoine de Gimestiere 06204 Nice cedex 3, France

<philippe.mangeot@inserm.fr>

Nous avons développé une technique originale pour assurer la livraison de la machinerie CRISPR/CAS9 dans la cellule primaire et dans l'animal. Notre approche repose sur la construction d'une protéine de fusion GAGmlv-CAS9 qui permet la production de pseudo-particules rétrovirales incorporant le complexe nucléoprotéique CAS9/gRNA. Dotées d'enveloppes virales fusogéniques, ces particules que nous appelons Nanoblades sont capables de livrer transitoirement un ou plusieurs RNPs-CRISPR et d'induire des éditions génétiques dans diverses cellules cibles primaires cibles dont des macrophages humains et murins, des cellules souches hématopoïétiques et des iPS humaines, pour lesquelles nous avons pu mesurer plus de 70 % d'altération génétique. Injectées dans la zone pellucide de zygotes murins, les Nanoblades peuvent présider à la genèse d'animaux transgéniques. Ces pseudo-particules sont également capables

de livrer une matrice de réparation simple brin ou double brin pour assurer des insertions génétiques (*knock in*) dans diverses lignées cellulaires. Des analyses par séquençage haut débit ont pu montrer que ces particules assuraient des coupures génétiques plus précises que d'autres procédés tel que la transfection. Enfin, l'injection de Nanoblades dans la souris permet d'altérer le génome de cellules du foie à hauteur de 20 % d'efficacité. Cette technologie polyvalente et peu coûteuse peut être facilement acquise par un laboratoire doté d'un L2 et habitué à la manipulation de particules virales. (<https://www.biorxiv.org/content/early/2017/10/12/202010>. Soumis).

O5

Un criblage CRISPR pour étudier les facteurs protégeant SAMHD1 identifie les IFITMs comme protéines bloquant l'entrée de particules virales pseudo-typées avec VSV-G

Ferdinand Roesch, Michael Emerman

Division of Basic Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA

<froesch@fredhutch.org>

SAMHD1 est un facteur de restriction inhibant l'étape de transcription inverse des rétrovirus et notamment du VIH-1. Certains lentivirus ont évolué de façon à bloquer l'action de cette protéine, notamment par le biais des protéines Vpr et Vpx qui dégradent SAMHD1 via le protéasome. Cependant, cet antagonisme viral peut être perturbé par des mécanismes cellulaires. Une étude récente a en effet démontré que le traitement de cellules THP1 par l'interféron (IFN) inhibe la dégradation de SAMHD1 par Vpx, suggérant l'existence d'un ou plusieurs *Interferon Stimulated Genes* (ISGs) impliqués dans ce phénomène. Nous avons confirmé ces résultats et conduit un criblage CRISPR, ciblé sur les ISGs et adapté au tri cellulaire en cytométrie en flux, afin d'identifier les protéines impliquées dans ce phénomène. Nous avons identifié les protéines IFITMs comme acteurs majeurs participant à ce phénotype. Ces protéines, exprimées notamment au sein des endosomes, bloquent la fusion initiée par VSV-G, l'enveloppe virale utilisée pour le pseudo-typage des particules virales contenant Vpx. Nous montrons que lorsqu'A-MLV, une enveloppe initiant la fusion membranaire à la membrane plasmique et non dans les endosomes, est utilisée pour le pseudo-typage, l'IFN et les IFITMs n'ont plus aucun effet sur la dégradation de SAMHD1. Nous avons mesuré l'entrée virale à l'aide de la technique Vpr-BLaM et observé que l'IFN et les IFITMs bloquent directement la fusion induite par VSV-G, démontrant ainsi que ce mécanisme, et non l'existence d'autres protéines interagissant directement avec SAMHD1 ou Vpx, explique la protection de SAMHD1 par l'IFN. Enfin, nous avons observé que l'enveloppe naturelle du VIH-1 est partiellement résistante à l'action des IFITMs et de l'IFN, comparée à VSV-G, ce qui souligne l'existence de différences importantes entre ces deux enveloppes. Cela suggère que l'enveloppe du VIH-1 pourrait avoir évolué afin d'utiliser d'autres mécanismes d'entrée, par exemple en évitant la voie d'endocytose, afin de contourner de tels facteurs de restriction. Ces résultats ont une importance particulière au vu de l'utilisation fréquente de VSV-G pour pseudo-typer les lentivirus et lentivecteurs. Cette étude démontre aussi l'utilité de notre méthode de criblage CRISPR qui pourra être adaptée afin de découvrir de nouvelles protéines bloquant d'autres enveloppes virales.

P1

Diversité et évolution de géants parmi les virus géants : les Pandora-virus

Matthieu Legendre¹, Elisabeth Fabre¹, Olivier Poirot¹, Sandra Jeudy¹, Audrey Lartigue¹, Jean-Marie Alempic¹, Laure Beucher², Nadège Philippe¹, Lionel Bertaux¹, Karine Labadie³, Yohann Couté³, Chantal Abergel¹, Jean-Michel Claverie¹

¹ Information génomique et structurale, Institut de microbiologie de la Méditerranée (IGS UMR 7256 FR3479 CNRS), CNRS UMR7256, Aix-Marseille Université, 13288 Marseille cedex 9, France

² CEA-Institut de génomique, Génoscope, Centre national de séquençage, CEA, Grenoble ; 2 rue Gaston Crémieux, CP5706, 91057 Évry cedex, France

³ Laboratoire de biologie à grande échelle EDyP (BGE UMR S1038/CEA/UGA), CEA, Inserm U1038, Université Grenoble Alpes, CEA -Grenoble/IRTSV 17 Rue des Martyrs 38054 Grenoble cedex 9, France <clavierie@igs.cnrs-mrs.fr>

Au début des années 1990 un parasite d'amibe fut découvert fortuitement dans une tour de refroidissement d'un hôpital de Bradford (Angleterre). Une quinzaine d'années plus tard, ce microorganisme, d'abord identifié comme une bactérie intracellulaire, s'est révélé être le premier virus géant jamais découvert : Mimivirus. Depuis, de nombreux efforts ont été faits afin d'identifier de nouvelles familles de virus géants à partir d'échantillons environnementaux variés, soit au travers d'études de métagenomique, soit par isolement direct en utilisant l'amibe *Acanthamoeba* comme hôte. En 2013, nous avons découvert une nouvelle famille de virus géants, les Pandoravirus, à partir d'échantillons de sédiments provenant du Chili (*Pandoravirus salinus*) et d'un étang d'eau douce en Australie (*Pandoravirus dulcis*). Ces virus présentent une très large particule virale ovoïde de $1 \times 0,5 \mu\text{m}$ et détiennent le record du plus grand génome viral, plus de 2,5 Mb, c'est-à-dire plus grand que celui de certains eucaryotes. En 2015, une nouvelle souche de pandoravirus (*Pandoravirus inopinatum*) a été isolée en Allemagne par un autre groupe. Depuis nous avons découvert trois nouveaux pandoravirus : *Pandoravirus quercus* à partir d'échantillons de sol à Marseille, *Pandoravirus neocaledonia* à Nouméa en Nouvelle-Calédonie et *Pandoravirus macleodensis* à Melbourne en Australie. Nous avons donc à présent 6 pandoravirus différents ainsi que leur séquence génomique complète ce qui permet une analyse comparative approfondie. Ainsi nous pouvons tenter de répondre aux deux questions suivantes : de quoi sont constitués les Pandoravirus ? et pourquoi ont-ils autant de gènes ? En plus des analyses de microscopie électronique, nous avons combiné différentes approches « omiques » : transcriptomique, protéomique et génomique comparative. Ces analyses nous ont permis de faire une annotation rigoureuse et fiable des gènes présents dans ces génomes. Nous avons aussi révélé un très grand nombre de transcrits non-codants (des lncRNAs). D'autre part, nous avons pu montrer que si la taille des génomes des Pandoravirus est en partie expliquée par un grand nombre de duplications de gènes, ils présentent aussi un très grand nombre de gènes spécifiques à chaque souche. En d'autres termes, le pangénom des Pandoravirus est ouvert. Le faible nombre de transferts de gènes horizontaux des cellules vers ces virus en revanche ne semblent pas contribuer significativement à la complexité de ces génomes. À la place, nous avons pu mettre en évidence ce qui semble être de la création de gènes *de novo* à partir des nombreuses régions intergéniques riches en GC. Ce mécanisme joue probablement un rôle dominant dans l'évolution des génomes des Pandoravirus.

P2

Interaction complexe entre le domaine Ovarian-Tumor (OTU) du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV) et la réponse immunitaire innée

Stéphanie Devignot, Friedemann Weber

Justus Liebig Universität Giessen, Institut für Virologie, FB10, Allemagne <stephanie.devignot@vetmed.uni-giessen.de>

La polymérase du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV) possède un domaine *Ovarian-Tumor* (OTU) aux activités protéasiques de dé-ubiquitination et dé-ISGylation. L'ubiquitine et l'*Interferon-Stimulated Gene 15* (ISG15) sont des petites protéines modificateuses, toutes deux impliquées dans la régulation de l'immunité innée. Des études préalables ont montré que la surexpression du domaine OTU ectopique inhibe la voie de signalisation NFκB et l'induction d'interféron de type I (IFN). Il a donc été suggéré que le domaine OTU fait partie d'une stratégie virale pour échapper à la réponse innée de l'hôte. Nous

avons étudié le rôle du domaine OTU dans le contexte de la polymérase pleine longueur et active, en utilisant les systèmes de miniréplicon et de pseudo-particules virales transcriptionnellement compétentes (tc-VLPs) (Devignot *et al.*, *J Virol*, 2015). Alors que le domaine OTU n'est pas requis pour la transcription dans le système de miniréplicon, peu de tc-VLPs peuvent être produits avec la polymérase inactive pour l'activité OTU. Par ailleurs, il n'a pas été possible de sauver le mutant par *trans-complémentation* avec le domaine OTU sauvage ectopique. Nous avons montré que la polymérase sauvage et la polymérase inactive pour l'activité OTU sont toutes deux sensibles de la même façon à l'IFN et que dans le contexte de la polymérase pleine longueur, le domaine OTU ne bloque pas la voie de signalisation de l'IFN. Cependant, alors que le domaine OTU ectopique bloque l'induction d'IFN, il n'y a pas d'inhibition dans le contexte de la polymérase pleine longueur. De façon surprenante, nos résultats les plus récents suggèrent la participation positive d'ISG15 dans le cycle viral de CCHFV. Pour conclure, nos résultats montrent que l'étude d'un domaine protéique particulier doit être réalisée dans le contexte de la protéine pleine longueur. Ainsi, les attributs anti-réponse innée prêtés au domaine OTU ne semblent pas se vérifier dans le contexte de la polymérase pleine longueur et transcriptionnellement active. Le rôle du domaine OTU de CCHFV en regard de la réponse innée doit être donc être approfondi.

P3

Le trafic de la protéine C du virus de l'encéphalite japonaise est médié par le moteur dynéine

Justine Basset¹, Melissanne De Wispelaere², Nathalie Pardigon¹

¹ Environnement et risques infectieux, Institut Pasteur de Paris, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France

² Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA, États-Unis <justine.basset@pasteur.fr>

De nombreux flavivirus (famille *Flaviviridae*) sont responsables de zoonoses majeures et de pathologies humaines telles que des encéphalites et des fièvres hémorragiques. Bien qu'il soit clair que la dynéine, un moteur moléculaire associé au cytosquelette, joue un rôle important dans le cycle infectieux des flavivirus, les mécanismes impliqués sont encore inconnus. Dans cette étude, nous avons utilisé un inhibiteur réversible de l'activité ATPase de la dynéine, la Ciliobrevin D (CD) afin d'étudier plus en détail le rôle de cette protéine durant le cycle infectieux de ces virus. L'effet de la CD a été testé sur différents flavivirus, notamment le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), le virus West Nile, le virus de la fièvre jaune et le virus Zika *in vitro*. Nous avons démontré que la dynéine est impliquée durant le cycle infectieux de ces virus. L'activité de ce moteur semble intervenir pendant une courte fenêtre de temps comprise entre 6 h et 15 h post-infection pour le virus JEV. De plus, le traitement par la CD inhibe également la réplication et la traduction virale à partir de 18 h post-infection. Cette inhibition est directement liée à l'activité ATPase du complexe dynéine. Enfin, nous avons observé que l'inhibition de la dynéine par la CD modifie la localisation nucléaire de la protéine de capsid (C) contrairement à celle de la protéine non structurale NS5 de JEV. Ce résultat suggère que le moteur dynéine est impliqué directement ou indirectement dans le transport des protéines C vers le noyau. Ainsi, nos résultats apportent un éclairage nouveau sur le rôle du moteur dynéine dans le cycle infectieux des flavivirus.

P4

Circulating monocytes participate in Zika virus brain invasion

Nilda Vanesa Ayala Nunez¹, Gillian L. Hale², Antonio Saviano¹, Laurent Mailly¹, Thomas Baumert¹, Brigid C. Bollweg², Sandrine Bourdoulous³, Muriel Couplier⁴, Sherif R. Zaki², Béatrice Uring-Lambert⁵, Raphaël Gaudin¹

¹ Inserm U1110, Institute of Viral and liver disease, 3 rue Koeberle 67000 Strasbourg, France

² *Infectious Diseases Pathology Branch, Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, États-Unis*

³ *Inserm U1016, Institut Cochin, 75014 Paris, France*

⁴ *UMR Virologie, Anses, Evry, INRA, UPE, École nationale vétérinaire d'Alfort, 7 av. du Général de Gaulle, 94704, Maisons-Alfort, France*

⁵ *Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Laboratoire central d'immunologie, Centre de recherche Inserm, 67000 Strasbourg, France <rgaudin@unistra.fr>*

The Zika virus (ZIKV) invades and persists in the central nervous system and has been associated with severe neurological diseases. How ZIKV disseminates from the blood-stream deep into the brain remains unclear. Here, we show that infiltrated leukocytes, microglia and perivascular macrophages are targeted by ZIKV in naturally infected human fetuses. Among leukocytes, human primary monocytes are readily infected and exhibit higher transmigration abilities through the blood-brain barrier. Using primary human cells co-cultured *ex vivo*, we found that monocytes efficiently transfer ZIKV to naïve neural progenitors. Furthermore, human monocytes incubated with mouse brain slices potently promote ZIKV infection as compared to cell-free virus. Finally, we propose the broad spectrum antiviral compound ZCL278 as a potent inhibitor of monocyte infection and virus spread to neuroprogenitors. Together our data support a model of dissemination of ZIKV into the brain mediated by blood-circulating monocytes as well as conceptual strategies to prevent it.

P5 Intérêt des lymphocytes primaires pour l'étude du virus de la bursite infectieuse aviaire

Sébastien Soubies¹, Céline Courtilon¹, Mouna Abed², Michel Amelot³, Alassane Keïta³, Sonja Haerthle⁴, Bernd Kaspers⁴, Nicolas Etteradossi¹

¹ *Anses Uvipac, laboratoire de Ploufragan-Plouzané, France*

² *ENSV, Alger, Algérie*

³ *Anses Seleac, laboratoire de Ploufragan-Plouzané, France*

⁴ *Veterinärwissenschaftliches Department, Institut für Tierphysiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Allemagne*

<sebastien.soubies@anses.fr>

L'avibirnavirus de la bursite infectieuse aviaire (nommé IBDV), membre de la famille des *Birnaviridae*, est responsable d'une affection immunodépressive et potentiellement mortelle chez le poulet. Ce virus, non enveloppé, possède un génome d'ARN double brin constitué par deux segments, respectivement nommés segment A et segment B. Le segment A possède deux cadre de lecture ouverts : le principal code la polyprotéine, qui s'autoclive pour produire la protéine de capsid VP2, la protéase virale VP4, la nucléoprotéine VP3 ainsi que des peptides importants pour l'entrée du virus ; le second cadre de lecture code la protéine non structurale VP5, notamment importante pour la sortie des cellules infectées. Le segment B code l'ARN polymérase virale ARN dépendante VP1. L'IBDV infecte et détruit les lymphocytes B en cours de développement situés dans la bourse cloacale (ou bourse de Fabricius), un organe lymphoïde primaire spécifique aux oiseaux. La plupart des souches sauvages et vaccinales d'IBDV ne se répliquent pas *in vitro* sans adaptation. Cette adaptation implique des mutations sur la protéine de capsid VP2, ce qui affecte le phénotype viral en induisant généralement une atténuation *in vivo* du virus. L'emploi de lymphocytes primaires de poulet issus de la bourse cloacale, cellules qui représentent la principale cible du virus, apparaît ainsi comme une stratégie pertinente pour étudier l'IBDV sans modifier son phénotype. Néanmoins, les lymphocytes issus de la bourse cloacale subissent dans les heures suivant leur isolement une apoptose spontanée qui limite leur utilité en l'état comme support cellulaire de la réplication virale. Pour contourner ce problème, le laboratoire a testé différents stimuli pour tenter de maintenir la viabilité des lymphocytes *ex vivo*. Parmi les réactifs testés, le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) a permis de maintenir une viabilité des

lymphocytes suffisante pour permettre la réplication à des titres élevés d'une souche vaccinale d'IBDV. De plus, ces lymphocytes stimulés par la PMA ont permis de développer un protocole de titrage des virus IBDV non adaptés à la culture cellulaire qui s'est révélé plus sensible que le système de référence basé sur l'inoculation aux œufs embryonnés. Enfin, ces lymphocytes stimulés ont permis d'évaluer la cinétique de réplication de souches non adaptées à la culture cellulaires après infection à une multiplicité d'infection très basse. Les lymphocytes issus de bourse cloacale de poulet stimulés par la PMA constituent donc un modèle de choix pour isoler, amplifier et étudier des souches d'IBDV non adaptées à la culture cellulaire et devraient faciliter la recherche sur ce virus.

P6 Décrypter le réseau d'interaction du rétrovirus HTLV-1 au centrosome dans le contexte de l'oncogenèse viro-induite

Elodie Teruel, Emilie Martin, Renaud Mahieux, Chloé Journo
Centre international de recherche en infectiologie, Inserm U1111-CNRS UMR5308, École normale supérieure de Lyon, LabEx Ecofect (CIRI), Université Claude Bernard-Lyon I, Inserm U1111, 69007, Lyon, France, <chloe.journo@ens-lyon.fr>

Le virus HTLV-1 (*Human T-cell Leukemia Virus type 1*) est l'agent causal de la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATL). La protéine virale Tax contribue à l'initiation du processus d'oncogenèse en perturbant la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN et le maintien de l'intégrité génétique de la cellule. Par ailleurs, l'expression de Tax induit une amplification des centrosomes aboutissant à l'instabilité chromosomique corrélée à l'apparition de cellules infectées aneuploïdes. Cependant, bien que l'altération par Tax de la réponse aux dommages de l'ADN ait bien été documentée, le lien fonctionnel avec les dysfonctions centrosomales induites par Tax n'a jamais été exploré. Cep63 est une protéine centrosomale qui régule la signalisation induite en réponse aux dommages de l'ADN. De plus, Cep63 intervient dans le maintien du nombre de centrosomes. Après la réalisation d'un crible double hybride (collaboration avec F. Tangy et P.-O. Vidalain), nous avons décrit Cep63 comme une potentielle cible de Tax. Notre objectif était d'une part de confirmer l'interaction de Tax avec Cep63 en utilisant d'autres approches, d'en explorer les conséquences fonctionnelles et de cartographier par une approche de protéomique innovante (BioID, *proximity-dependent biotin identification*) le réseau d'interactants centrosomaux de Tax et leurs conséquences. L'interaction entre Tax et Cep63 a été confirmée par co-immunoprécipitation dans des cellules humaines U2OS et dans les lignées de lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1. Les déterminismes moléculaires de l'interaction Tax/Cep63 ont ensuite été analysés à l'aide de mutants des deux protéines. La localisation de Cep63 au centrosome dans des cellules exprimant ou non Tax et l'implication de Cep63 dans l'amplification des centrosomes induite par Tax ont ensuite été évaluées par microscopie. En parallèle, nous mettons en œuvre une approche de cartographie de façon générale le réseau d'interactants de Tax au centrosome. Pour cela, Tax a été fusionnée au domaine biotine-ligase BirA qui permet la biotinylation de proximité dans un rayon de 10 nm. L'expression de la construction Tax-BirA, la fonctionnalité du domaine BirA ainsi que la conservation des fonctions initiales de Tax ont été vérifiées. Après purification des protéines biotinylées sur colonne de streptavidine en conditions dénaturantes, celles-ci sont analysées par spectrométrie de masse. Ces travaux visent à valider l'approche de protéomique BioID pour caractériser le réseau d'interactions de Tax au centrosome. L'étude des conséquences de ces interactions sur la modulation de la réponse aux dommages à l'ADN ainsi que sur l'amplification des centrosomes viro-induites seront d'un grand intérêt dans la compréhension des mécanismes d'oncogenèse virale.

P7 Étude de A1, une protéine précoce multitâche du bactériophage T5

Léo Zangelmi, Madalena Renouard, Ombeline Rossier, Jean Lepault, Pascale Boulanger

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), UMR9198, CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UMR9198, CEA, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France
<leo.zangelmi@i2bc.paris-saclay.fr>

Immédiatement après l'injection de leur génome dans leur hôte, les phages lytiques inhibent les mécanismes de défense et détournent les machineries de biosynthèse de la bactérie pour établir un environnement favorable à la réplication virale. Les fonctions des gènes précoces qui gouvernent cette prise de contrôle de l'hôte sont encore mal connues chez la plupart des bactériophages. Leur caractérisation présente un intérêt majeur pour comprendre comment certaines fonctions vitales de la bactérie sont neutralisées par les phages et ouvrir la voie vers la recherche de nouveaux agents antibactériens. Le bactériophage T5 transfère son ADN (121 kbp) dans le cytoplasme de la bactérie *Escherichia coli* en deux étapes [1]. Seuls 8 % du génome entrent dans la cellule au début de l'infection, puis le transfert s'arrête. Pendant la pause, l'expression des gènes codés par cette portion de l'ADN conduit chez l'hôte à la dégradation du chromosome, à l'arrêt de l'expression des gènes et à l'inactivation des systèmes de défense (restriction/méthylation, réparation de l'ADN) [2]. Après quelques minutes, le transfert de l'ADN de T5 reprend, ce qui permet l'expression des autres gènes de T5 et le déroulement du cycle viral jusqu'à la production de nouveaux phages. Ce mécanisme original d'injection de l'ADN facilite l'identification et la caractérisation fonctionnelle des gènes précoces responsables de la prise de contrôle de l'hôte, car ils sont regroupés sur le génome. Deux protéines précoces de T5, A1 et A2, sont requises pour la reprise du transfert de l'ADN. De plus, A1 est essentielle pour la dégradation de l'ADN de l'hôte. Nous avons démontré que A1 a une activité exo- et endo-nucléase *in vitro*. Par ailleurs, l'expression ectopique d'A1 dans *E. coli* est suffisante pour observer la dégradation de l'ADN de l'hôte par microscopie de fluorescence. Nos résultats indiquent qu'A1 pourrait être le facteur responsable de la dégradation massive de l'ADN de l'hôte observée après le premier transfert d'ADN. En combinant des approches de bioinformatique, mutagenèse dirigée et complémentation fonctionnelle, nous avons identifié certains acides aminés essentiels pour l'infection et l'activité nucléase. Nos résultats soulèvent une question intrigante : comment l'activité nucléase de A1 peut-elle être couplée à la reprise du transfert de l'ADN du phage ?

1. Lanni YT. *Bacteriol Rev* 1968 ; 32 : 227-42.
2. Davison J. *Bacteriophage* 2015 ; 25 ; 5.

P8

Décrypter les mécanismes responsables des déformations membranaires générées par la protéine non structurale 1 du virus Chikungunya

William Bakhache, Eric Bernard¹, Patrick Eldin¹, Aymeric Neyret¹, Laurence Briant¹

¹ IRIM Institut de recherche en infectiologie de Montpellier, CNRS UMR9004, Université Montpellier I, France
<laurence.briant@irim.cnrs.fr>

Le virus du chikungunya (CHIKV) est un alphavirus transmis à l'homme par le moustique infecté. Au cours de la dernière décennie, ce virus s'est propagé dans de nombreuses régions du monde. Chez l'homme, le CHIKV génère une forte fièvre, une éruption pétiéchielle, des douleurs musculaires et articulaires. Bien que ces symptômes disparaissent généralement en quelques jours, des arthralgies chroniques incapacitantes pour lesquelles il n'existe aucun traitement ont été observées chez de nombreux patients. La réplication du CHIKV est hébergée dans des organelles formées initialement au niveau de la membrane plasmique et connues sous le nom de sphérules. Ces compartiments membranaires d'environ 50 nm de diamètre connectés au cytoplasme par un pore étroit concentrent l'ARN viral, les protéines non structurales formant la machinerie de réplication du CHIKV ainsi que les cofacteurs cellulaires de celle-ci. Les mécanismes mis en jeu dans la formation de ces compartiments sont inconnus. Leur identifica-

tion représente un enjeu dans le développement de stratégies susceptibles d'interrompre la réplication virale.

La protéine non structurale 1 (nsP1) est une méthyl/guanylyltransférase impliquée dans la formation de la coiffe des ARN viraux néosynthétisés. Cette protéine palmitoylée se caractérise par un domaine central structuré en alpha-hélice permettant l'ancrage membranaire du complexe de réplication dans les sphérules. Exprimée de façon isolée, nsP1 génère des déformations des membranes cellulaires similaires à des filopodes. Ces propriétés permettent d'envisager la contribution de nsP1 à la formation des sphérules. Notre objectif est de décrypter les mécanismes responsables des déformations membranaires générées par nsP1. Notre stratégie consiste à définir les domaines de nsP1 impliqués dans ces déformations et à identifier la machinerie cellulaire détournée par cette protéine pour remodeler les membranes de l'hôte. La contribution des mécanismes ainsi identifiés sera évaluée dans la formation des sphérules et la réplication virale afin de préciser les fonctions de nsP1 au cours de la réplication du CHIKV.

P9

Validation d'interactions moléculaires candidates entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule-hôte bovine

Manon Borde, Quentin Richard, Eve Laloy, Grégory Caignard, Anthony Relmy, Aurore Romey, Kamila Gorna, Damien Vitour, Stéphan Zientara, Labib Bakkali-Kassimi, Sandra Blaise-Boisseau
Université Paris-Est, Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort, Laboratoire de référence nationale et OIE pour la fièvre aphteuse, UMR Virologie 1161, Anses, INRA, ENVA, France
<sandra.blaise-boisseau@anses.fr>

La fièvre aphteuse (FA) est une maladie animale virale très contagieuse affectant les artiodactyles domestiques et sauvages, principalement les bovins, porcins, ovins et caprins. Le virus responsable est le FMDV (*Foot and Mouth Disease Virus*), un *Aphovirus* de la famille *Picornaviridae*. Le FMDV présente 7 sérotypes différents, chacun présentant plusieurs sous-types. Suite à l'infection aiguë des bovins par le FMDV, 15 à 50 % des ruminants deviennent infectés de façon persistante, indépendamment de leur statut vaccinal. De tels animaux, chez qui le virus vivant peut-être isolé plus de 28 jours après l'infection au niveau des tissus oropharyngés, sont définis comme « porteurs asymptomatiques » et représentent un risque potentiel de transmission du virus aux animaux sensibles. Les mécanismes d'établissement et de maintien de la persistance ne sont en effet pas clairement élucidés à ce jour mais des travaux menés *in vitro* comme *in vivo* indiquent une co-évolution du FMDV et des cellules-hôtes au cours de la persistance. Dans ce contexte, nos travaux de recherche visent à étudier les interactions entre le FMDV et l'hôte et plus particulièrement la réponse immunitaire innée induite par ce virus et sa modulation dans le cadre d'une infection persistante dans des modèles de cellules épithéliales bovines développés au laboratoire. Nous avons précédemment entrepris l'étude de l'« interactome » du FMDV de type O isolat O/FRA/1/2001 (13 protéines) par la méthode du double hybride en levure en criblant une banque d'ADNc bovine. L'ensemble des cribles a ainsi permis de mettre en évidence 11 interactions candidates entre protéines du FMDV et protéines de l'hôte, impliquant potentiellement 3 voies de signalisation (immunité innée, apoptose et autophagie). En parallèle, les modèles cellulaires d'infection persistante ont permis de collecter des virus aphteux « persistants » et d'identifier des mutations dans ces virus. Notre objectif est à présent de valider biochimiquement les interactions moléculaires candidates issues des cribles en levure. Cette validation sera réalisée notamment par des expériences de chromatographies d'affinité (*GST pull down*), co-immunoprécipitation, *western-blot* et/ou de co-localisation par immunofluorescence. Les gènes codant les protéines cellulaires candidates sont en cours de clonage dans les vecteurs d'expression adéquats par la technique Gateway. Ce travail sera ensuite étendu en comparant les interactions établies par des protéines de virus FMDV « persistants ». En parallèle, nous allons construire un clone infectieux ADNc du FMDV de type O afin de disposer d'un système de génétique inverse permettant

d'étudier l'impact des mutations identifiées au cours de la persistance sur les interactions virus/cellule bovine. Ce clone infectieux sera construit par assemblage linéaire de produits de PCR chevauchants en utilisant la technique de "USER fusion". Ceci permettra de générer un ADNc complet linéaire sous promoteur T7 permettant sa transcription ultérieure. Le virus aphteux recombinant pourra ensuite être obtenu après transfection de cet ADNc dans des cellules sensibles. Les données de cette étude devraient nous permettre de mieux comprendre la pathogenèse du FMDV par l'identification des voies de signalisation cellulaires modulées au cours de l'infection (aiguë ou persistante) et pourraient donc contribuer au développement de meilleures stratégies de contrôle de la fièvre aphteuse.

P10

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

Cindy Kundlacz¹, Aurore Fablet¹, Rayane Amaral Da Silva Moraes¹, Marie Pourcelot¹, Corinne Saillieu¹, Cyril Viarouge¹, Emmanuel Breard¹, Axel Gorlier¹, Yves Jacob², Edouard Hirschaud³, Fabrice Touzain³, Pierrick Lucas³, Yannick Blanchard³, Stéphan Zientara¹, Grégory Caignard¹, Damien Vitour¹

¹UMR1161 Virologie, Anses-INRA-ENVA, 94700 Maisons-Alfort, France

²Laboratoire de génétique moléculaire des virus à ARN, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

³Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité génétique virale et biosécurité, Anses, 22440 Ploufragan, France

<cindy.kundlacz@vet-alfort.fr>

Le virus de la fièvre catarrhale ovine (*Bluetongue virus*, BTV) est l'agent étiologique de la fièvre catarrhale ovine, une arbovirose non contagieuse transmise aux ruminants domestiques et sauvages par l'intermédiaire de morsures de mouches hématophages du genre *Culicoides*. Il existe actuellement 27 sérotypes décrits de BTV à travers le monde dont les sérotypes 4 et 8 qui ont très récemment (ré)-émergé en France avec notamment 2862 cas recensés de BTV-8 depuis septembre 2015 (<http://agriculture.gouv.fr>). Les sérotypes de BTV se distinguent par les pathologies qu'ils induisent et leur capacité à infecter et se propager chez leur(s) hôte(s) mammifère(s). Par exemple, le BTV-8 infecte tout type de ruminants mais c'est le seul à provoquer des signes cliniques chez le bovin tandis que le BTV-2 infecte uniquement les caprins sans provoquer de signes cliniques. L'un de nos objectifs de recherche vise à identifier les interactions cellulaires spécifiques des sérotypes 8 et 27 pour expliquer leurs différences de pathogénicité/virulence et/ou de franchissement de barrière d'espèces. Pour atteindre cet objectif, j'ai participé au clonage et au criblage à haut-débit des interactions protéines-protéines basé sur l'utilisation de la technique du double-hybride en levure. Cet outil m'a permis de cribler l'ensemble des protéines virales du BTV contre deux banques d'ADN complémentaire, l'une d'origine bovine et l'autre d'origine *Culicoides*. Ces banques ont été choisies pour permettre une comparaison des interactions virus-hôte à plusieurs niveaux : viral (différents sérotypes du BTV) et hôte (mammifère vs vecteur). Par cette approche, une centaine de nouvelles interactions virus-hôte ont déjà été mises en évidence et celles-ci semblent spécifiques soit du sérotype, soit de l'hôte mammifère ou vecteur. L'analyse de ces interactions montre clairement un enrichissement pour des facteurs cellulaires impliqués dans les voies de l'apoptose, de l'ubiquitination/sumoylation et de l'autophagie. Celles-ci ont été sélectionnées pour être validées sur le plan biochimique et fonctionnel, notamment pour expliquer leur rôle dans le détournement de la machinerie cellulaire au profit du virus et l'échappement viral. En parallèle à ce travail d'interactomique, nous étudions l'effet du BTV sur différentes voies de signalisation cellulaires. En plus de son rôle antagoniste sur la voie des interférons de type I, nous avons révélé une nouvelle fonction portée par la protéine NS3 du BTV sur la voie MAPK/ERK comme activatrice de celle-ci. L'utilisation des inhibiteurs U0126 (ciblant les protéines MEK1/2) et GW5074 (ciblant la protéine C-Raf) nous ont permis d'affiner

le niveau d'action de la protéine NS3 sur cette voie, en aval du récepteur à l'EGF et en amont de C-Raf. Cette voie de signalisation peut être activée au niveau de trois compartiments cellulaires différents : la membrane plasmique, l'appareil de Golgi et l'endosome. Des résultats préliminaires laissent supposer que la NS3 active principalement la voie MAPK/ERK au niveau de l'appareil de Golgi. L'activation de la voie par la protéine NS3 pourrait être un mécanisme de détournement de la machinerie cellulaire au profit de la réplication du virus et pourrait également constituer un élément de réponse pour expliquer l'hyper-inflammation observée dans le cas d'une infection par ce virus.

P11

Modélisation pathologique de l'infection par TBEV en utilisant des cellules neurales humaines dérivées de progéniteurs fœtaux

Mazigh Fares¹, Gaele Gonzalez¹, Marielle Cochet¹, Nadia Haddad², Muriel Couplier¹

¹Unité de virologie (VIRO), INRA, Anses, ENVA UMR956, 7 av. du Général de Gaulle, 94700, Maisons-Alfort, France

²Unité de biologie moléculaire et immunologie parasitaires (BIPAR), INRA, Anses, ENVA UMR956, 7 av. du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France

<mazigh.fares@vet-alfort.fr>

Le virus de l'encéphalite à tiques (*Tick-borne encephalitis virus* ou TBEV), membre de la famille *Flaviviridae* et du genre *Flavivirus*, est, d'un point de vue médical, l'arbovirus le plus important en Europe et en Asie du Nord-Est. Il est responsable de symptômes fébriles et, dans certains cas, de manifestations neurologiques allant de la méningite légère à l'encéphalomyélite sévère pouvant être fatale. Les neurones ont été décrits comme étant la cible principale de l'infection dans le cerveau, mais la neuropathogenèse induite par TBEV reste peu caractérisée. Nous avons utilisé un modèle *in vitro* de cellules neurales humaines différenciées à partir de progéniteurs neuraux fœtaux pour modéliser la pathologie induite par le virus et élucider les mécanismes par lesquels il infecte et affecte les cellules du système nerveux central. Nos résultats montrent que les cellules neuronales et les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) sont permmissives à TBEV. Nous avons observé un effet cytopathique dans les neurones dès 72 heures post-infection (PI), suivi d'une réduction progressive de leur nombre due à une mort par apoptose (analyse durant 14 jours PI). À l'inverse, la survie des cellules gliales n'est pas affectée. Néanmoins, la morphologie des astrocytes est altérée et une hypertrophie suggérant un état réactif a été observée. Ainsi, au moins deux événements majeurs de la pathologie induite par TBEV dans le cerveau humain, perte neuronale et réactivité astrocytaire, sont reproduits *in vitro* dans le modèle cellulaire utilisé. De plus, nous avons établi des modèles de neurones et d'astrocytes et nous investiguons le rôle des astrocytes dans la mort neuronale. Par ailleurs, pour étudier la réponse cellulaire à l'infection, nous avons analysé les niveaux d'expression de gènes de la réponse antivirale en utilisant une *PCR array*. Nous avons montré l'existence d'une forte réponse antivirale qui se caractérise par une surexpression de senseurs viraux, de cytokines et de gènes stimulés par l'interféron (ISGs). En utilisant des approches d'ARN interférence, nous cherchons maintenant à déterminer le rôle de chaque senseur viral dans la reconnaissance de TBEV. Nous avons donc développé un nouveau modèle *in vitro* d'infection des cellules neurales par TBEV que nous utilisons actuellement pour approfondir la compréhension de la neuropathogenèse induite par le virus.

P12

Impact du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine de capsid ORF2 sur le cycle infectieux du virus de l'hépatite E

Maliki Ankavay¹, Claire Montpellier, Cécile-Marie Aliouat, Jean Dubuisson, Laurence Cocquerel

¹ Centre d'infection et d'immunité de Lille (CIIL), Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 8204, Lille, France
<laurence.cocquerel@ibl.cnrs.fr>

Le virus de l'hépatite E (HEV) est un problème de santé publique dans le monde. Environ 20 millions de personnes sont infectées chaque année. Le nombre de décès liés à cette infection est estimé à environ 70 000 par an. Le génome du HEV code trois protéines : la protéine ORF1 qui est une polyprotéine impliquée dans la réplication virale, la protéine de capsid virale ORF2 et la protéine phosphoprotéine ORF3. Peu de données sont disponibles sur le cycle infectieux du HEV du fait de l'absence jusqu'à récemment d'un système de culture efficace pour l'étude de ce virus. Nous avons mis en place un système de culture cellulaire pour le HEV permettant d'étudier les aspects fondamentaux de son cycle infectieux (Montpellier *et al.*, 2017). Nous avons également montré qu'au cours de son cycle infectieux, le HEV produit 3 formes de la protéine de capsid ORF2 : ORF2i, ORF2g et ORF2c. La protéine ORF2i est la forme associée aux particules infectieuses alors que les protéines ORF2g et ORF2c sont des glycoprotéines massivement produites, non associées aux particules infectieuses. (Montpellier *et al.*, 2017). La protéine de capsid ORF2 est une glycoprotéine de 660 acides aminés (aa) qui présente trois sites potentiels de N-glycosylation. De manière intéressante, une étude approfondie de la protéine ORF2 et notamment de l'importance de sa N-glycosylation (Ankavay *et al.*, soumis pour publication) nous a permis de montrer que la protéine ORF2i, en plus de sa localisation cytoplasmique, présente également une localisation nucléaire. Cette localisation nucléaire a aussi été observée récemment (Lenggenhager *et al.*, 2017). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'import nucléaire de l'ORF2 ne sont pas connus à ce jour. L'objectif de ce travail est donc d'étudier les mécanismes d'import nucléaire de l'ORF2 et de déterminer l'impact de cette localisation nucléaire sur le cycle infectieux du HEV. Les approches de bioinformatique, de mutagenèse dirigée, de génétique inverse, de microscopie confocale, de fractionnement subcellulaire, de Western Blot, de qRT-PCR, de titrage, de co-immunoprécipitation et de spectrométrie de masse sont utilisées dans la réalisation de ce projet. Des inhibiteurs d'import et d'export nucléaires sont également testés. Toutes ces approches sont réalisées dans un système infectieux en utilisant le génome complet du HEV (génotype 3f, souche p6). Nos résultats montrent pour la première fois que la protéine ORF2 possède un signal d'import nucléaire classique (NLS classique). Nous montrons que ce NLS régule non seulement l'import nucléaire de l'ORF2 mais aussi sa translocation réticulaire. Nos résultats révèlent aussi que l'ORF2 colocalise et interagirait avec l'Importin alpha1 afin d'être importée dans le noyau des cellules infectées par le HEV. En utilisant un inhibiteur d'export nucléaire, nous montrons que l'ORF2 est également exportée du noyau. L'identification du signal d'export nucléaire (NES) de l'ORF2 est en cours de réalisation. L'étude de l'impact de l'import et de l'export nucléaire de l'ORF2 au cours du cycle infectieux du HEV a été initiée. Une meilleure compréhension du rôle du transport nucléo-cytoplasmique de l'ORF2 dans le cycle infectieux du HEV pourrait permettre d'orienter des stratégies antivirales contre ce virus.

P13

La traduction IRES de l'ARN génomique du VIH-1

Sylvain De Breyne¹, Christelle Daude^{1,2}, Didier Decimo¹, Bruno Sargueil³, Theophile Ohlmann¹

¹ Centre international de recherche en infectiologie, CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École normale supérieure de Lyon, Univ Lyon, 69007, Lyon, France

² Centre de recherche en neurosciences de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université Jean Monnet [Saint-Etienne], Université de Lyon, Inserm U1028, CNRS UMR5292, CH Le Vinatier, 95 bd Pinel, bat B13 59 69677 Bron cedex, France

³ Laboratoire de cristallographie et RMN biologiques (LCRB), CNRS

UMR8015, Université Paris V-Paris Descartes, Faculté de pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire 75270 Paris cedex 06, France
<tohlmann@ens-lyon.fr>

La forme non épissée de l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) de type 1 est le support pour la traduction des deux polyprotéines GAG et GAG-POL. Pour ce faire, il est nécessaire que le ribosome interagisse avec l'ARNm. Cette étape, complexe et variée chez le VIH-1, s'effectue en grande partie par un mécanisme classique où au moins 12 facteurs de l'initiation participent à l'attachement du ribosome à la coiffe du messager suivi d'un balayage de la région 5' non traduite afin d'identifier le codon d'initiation et entamer la synthèse protéique. Cependant, lors de l'infection, l'état de la cellule est modifié ce qui altère l'intégrité de certains facteurs de la traduction réduisant ainsi le recrutement du ribosome à la coiffe. En revanche, il existe au sein de l'ARN génomique deux sites d'entrée interne du ribosome (IRES) indépendants et localisés au niveau de la 5'UTR et de la région qui code le peptide matrice dans GAG. Les IRES permettraient ainsi de continuer le recrutement des complexes ribosomiaux en l'absence de certains facteurs de l'initiation. Les mécanismes par lesquels les ribosomes interagissent avec les IRES du VIH-1, restent encore assez peu compris. Nos résultats montrent que l'IRES de la région codante a la capacité d'exprimer une isoforme courte de Gag dans différents systèmes d'étude de la traduction : le lysat de réticulocytes (modèle *in vitro*), dans des lignées lymphocytaires (modèle *ex vivo*), des systèmes hybrides de traduction et surtout au cours de l'infection de cellules en culture. De plus, ces caractéristiques sont conservées au niveau de séquences issues de patients cliniques. Ces résultats renforcent l'hypothèse que Gag p40 joue un rôle durant l'infection que nous voulons déterminer. Enfin, nous apportons de nouveaux éléments « mécaniques » dans la compréhension et l'étude de la traduction IRES (5'UTR et région codante) chez le HIV-1.

P14

Analyse de la spécificité des interactions entre le PDZome humain et la protéine NS5 du virus West Nile par deux approches d'interactomique à haut débit

Emilie Giraud¹, Chloé Otero Del Val¹, Celia Caillet-Saguy¹, Yves Jacob², Nicolas Wolff¹, Nathalie Pardigon³

¹ Unité récepteurs-canaux, Institut Pasteur de Paris, France

² Unité de génétique moléculaire des virus ARN, Institut Pasteur de Paris, France

³ Environnement et risques infectieux, Institut Pasteur de Paris, France
<nathalie.pardigon@pasteur.fr>

Le virus West Nile (WN) est un arbovirus appartenant à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. Il est considéré comme l'arbovirus le plus répandu dans le monde. Ce virus a pour réservoir les oiseaux et est transmis lors d'un repas sanguin par des moustiques, principalement du genre *Culex*. L'homme et le cheval sont des hôtes accidentels chez lesquels l'infection peut se traduire par des encéphalites parfois fatales. Comme d'autres pathogènes intracellulaires, le virus WN détourne les fonctions cellulaires principalement au travers d'interactions protéiques pour effectuer son cycle de réplication. Le protéome humain comprend 152 protéines contenant un ou plusieurs domaines globulaires de type PDZ impliqués dans des interactions entre protéines. Au total 266 domaines PDZ reconnaissant spécifiquement de courts motifs linéaires appelés PBM (PDZ-binding motif) ont été répertoriés. Les motifs PBM sont présents chez un grand nombre de protéines cellulaires mais également dans certaines protéines virales comme la protéine non structurale 5 (NS5) du virus WN. Les protéines humaines contenant des domaines PDZ ont, pour la plupart, des fonctions essentielles dans la cellule et sont des cibles potentielles pour des interactions avec un motif PBM d'une protéine virale. Lors d'une infection, les protéines virales contenant un motif PBM peuvent ainsi perturber la signalisation de la cellule en entrant en compétition avec des protéines cellulaires qui possèdent elles aussi un motif PBM (ligands endogènes). Les interactions PDZ cellulaires/PBM viraux peuvent ainsi

faciliter le cycle viral dans les cellules hôtes et favoriser la dissémination du virus.

L'objectif de cette étude est de cartographier les interactions entre un motif PBM de la protéine NS5 du virus WN et la banque complète des PDZ humains (PDZome) sous forme simple ou en tandem par une technique d'étude interactomique *in vitro* à haut débit (*Hold-Up Assay*). Nous avons par ailleurs validé la capacité de la protéine complète NS5 contenant le PBM à interagir avec cette banque PDZome dans un système *in cellulo* en utilisant une technique à haut débit de complémentation (NPCA : *NanoLuciferase Protein Complementation Assay*).

Ces deux techniques à haut débit, réalisées *in vitro* et *in cellulo*, nous ont permis d'établir une liste de protéines contenant des PDZ interagissant avec la protéine NS5 du virus WN via son PBM, notamment RIMS2, TJP1, SNX27, USH1C, SHANK2 et HTRA1. Ces protéines sont impliquées dans : i) l'exocytose au niveau des membranes synaptiques ; ii) la transduction du signal pour l'assemblage des jonctions serrées ; iii) le transport rétrograde de l'endosome à la membrane plasmique ; et iv) l'interaction avec la matrice extracellulaire. Ces résultats montrent que la séquence PBM de la protéine NS5 du virus WN est capable d'interagir avec plusieurs protéines humaines contenant des PDZ. Nous avons ainsi établi le profil d'affinité/spécificité potentiel de la protéine virale vis-à-vis du PDZome humain. Le contrôle de ces interactions PBM/PDZ pourrait conduire au développement de nouvelles thérapies antivirales.

P15

Rôle de la protéine X du BoDV dans la dynamique et la physiologie mitochondriale

Karine Bourgade¹, Anne Thouard, Daniel Dunia

¹ Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Université Paul Sabatier-Toulouse 3, Inserm U1043, CNRS UMR5282, Hôpital Purpan, place du docteur Baylac BP 3028 31024 Toulouse cedex 3, France <daniel.dunia@inserm.fr>

Le bornavirus (ou BoDV) est un virus à ARN de polarité négative (*Mononegavirales*). Ce virus neurotrope et non-cytopathique infecte principalement les neurones du système limbique, siège de nombreuses fonctions cognitives et comportementales, conduisant à des maladies diverses allant d'une encéphalite aiguë à des troubles comportementaux divers. Nous nous intéressons à la protéine non-structurale X du BoDV, qui se localise à la fois dans le noyau et les mitochondries des neurones après infection. Les fonctions de cette protéine sont encore en cours d'étude mais il a été montré dans l'équipe qu'elle possédait un pouvoir neuroprotecteur. Sa localisation dans la mitochondrie, réservoir de l'énergie cellulaire et siège de l'apoptose, pourrait avoir un lien avec ce rôle neuroprotecteur. Dans ce contexte, notre objectif est de mieux comprendre l'impact de cette protéine sur la mitochondrie et la physiologie neuronale. Par criblage en double hybride chez la levure, nous avons obtenu une liste de 19 protéines cellulaires interagissant fortement avec la protéine X. Nous nous sommes principalement concentrés sur les protéines en relation avec la physiologie mitochondriale et neuronale, afin de confirmer leur interaction avec la protéine X, en utilisant notamment des cultures primaires de neurones de rats embryonnaires. Nous cherchons également à préciser le site de l'interaction sur la protéine X et à évaluer le rôle de ces interactions dans la neuroprotection médiée par X.

En parallèle, nous cherchons à évaluer l'effet de la protéine X sur la dynamique mitochondriale qui inclut les phénomènes de fission et de fusion des mitochondries entre elles. Nous cherchons à déterminer si la protéine X pourrait modifier ces mécanismes, ce qui pourrait contribuer à ses effets neuroprotecteurs. Nous présenterons les premiers résultats de ces analyses qui révèlent un impact de la protéine X sur certaines protéines cellulaires importantes pour la physiologie mitochondriale ainsi que sur une augmentation des mécanismes de fusion des mitochondries en réponse à la fragmentation induite par la thapsigargine, un inhibiteur de pompes calciques.

P16

Cribles CRISPR/Cas9 à l'échelle du génome humain pour l'identification de nouveaux inhibiteurs du VIH-1 induits par l'interféron

Boris Bonaventure¹, Olivier Moncorgé¹, Antoine Rebendenne¹, Jean-Luc Battini¹, Valérie Courgnaud², Caroline Goujon¹

¹ Institut de recherche en infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, CNRS UMR 9004 CPBS, 1919 Route de Mende 34293 Montpellier cedex 5, France

² Institut de génétique moléculaire de Montpellier (IGMM), Centre hospitalier régional universitaire, Inserm, Université de Montpellier, CNRS UMR5535, 1919, Route de Mende 34293 Montpellier cedex 5, France <caroline.goujon@irim.cnrs.fr>

Le système interféron (IFN) constitue une des premières lignes de défense de l'organisme face aux infections virales. Après détection de pathogènes intracellulaires, les cellules infectées sécrètent de l'IFN qui induit l'expression de plusieurs centaines de gènes (les *interferon-stimulated genes*, ou ISG) dans les cellules infectées et les avoisinantes. Les ISG permettent d'induire un état antiviral, car ils codent notamment des effecteurs antiviraux, capables d'inhiber la réplication virale. Il est connu depuis longtemps que les cellules cibles du VIH-1 deviennent réfractaires à l'infection suite à un traitement par de l'IFN. Cette inhibition est en partie exercée par un membre de la superfamille de la Dynamine, la GTPase MX2. MX2 inhibe l'import nucléaire et l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Cependant, l'IFN inhibe également l'accumulation de l'ADN viral et les facteurs responsables restent inconnus. Afin d'identifier ces effecteurs antiviraux, nous avons développé un crible fonctionnel à l'échelle du génome humain basé sur la technologie CRISPR-Cas9. Nous avons utilisé la banque d'ARN guides GeCKO qui cible plus de 19 000 gènes humains et qui a été développée par le groupe du Pr Feng Zhang. Nous avons ainsi généré des populations de cellules invalidées pour la majorité des gènes humains. Ces populations de cellules ont été ensuite traitées à l'IFN afin d'induire l'expression des ISG et l'établissement de l'état antiviral. Puis les cellules ont été mises en présence du VIH-1 et celles qui ont été infectées en dépit du traitement IFN ont été sélectionnées et amplifiées. Les ARN guides exprimés au sein des populations sélectionnées après plusieurs cycles de traitement IFN, infection et sélection ont été identifiés par séquençage haut débit. Les gènes appartenant à la cascade de signalisation de l'IFN de type I représentent environ 40 % des gènes identifiés, validant ainsi la stratégie du crible. De façon intéressante, le crible nous a permis d'identifier d'autres gènes dont l'inactivation permet de restaurer partiellement l'infection par le VIH-1, dans le contexte de l'état antiviral induit par l'IFN. Ces gènes peuvent être des régulateurs inconnus de la voie de réponse à l'IFN, des inhibiteurs du VIH-1 ou encore des régulateurs de ces inhibiteurs. Des travaux sont en cours afin de discriminer ces différentes hypothèses et de caractériser le rôle de ces gènes dans l'inhibition du VIH-1 par l'IFN.

Ce projet est financé par Sidaction, l'ANRS et le programme ATIP-Avenir.

P17

Cartographie des interactions protéiques entre les flavivirus transmis par les tiques et leurs différents hôtes mammifères

Manon Lemasson¹, Grégory Caignard¹, Yves Unterfinger¹, Steeve Lowenski¹, Jessy Vandekerckhove¹, Cecile Beck¹, Sylvie Lecollinet¹, Sara Moutailler², Houssam Attoui¹, Damien Vitour¹, Jennifer Richardson¹, Sandrine Lacour¹

¹ UMR 1161 Virologie, Anses-INRA-ENVA, France

² UMR 956 Bipar, Anses-INRA-ENVA, France

<manon.lemasson@vet-alfort.fr>

Quarante pour cent des virus pathogènes de mammifères sont transmis par des arthropodes et cette fréquence ne cesse d'augmenter. En Europe, les tiques sont les premiers vecteurs d'agents infectieux, hommes et animaux confondus. Le virus de l'encéphalite à tique (TBEV, *tick-borne encephalitis virus*) est le virus humain majoritairement transmis par les tiques en

Europe. Il est d'ailleurs placé sur la liste des pathogènes sous surveillance épidémiologique de la Commission de l'Union européenne. Le virus Louping ill (LIV), peu étudié, constitue quant à lui un problème majeur de santé animale au Royaume-Uni. Ces deux flavivirus phylogénétiquement très proches sont transmis par la même tique *Ixodes ricinus*. Ils induisent tous deux des méningo-encéphalites mais chez des hôtes différents : l'homme pour le TBEV et les ruminants pour le LIV. La compréhension du dialogue moléculaire entre le virus et son hôte mammifère apparaît alors comme un prérequis pour identifier les déterminants moléculaires de la compétence vectorielle et les mécanismes moléculaires du franchissement de barrière d'espèce. L'objectif de notre étude est de résoudre et comparer les réseaux d'interactions protéiques établis entre TBEV et LIV et leurs hôtes mammifères. Une cartographie des interactions protéiques a alors été établie entre l'ensemble des protéines de TBEV, de LIV et celles codées par les banques d'ADNc humaine et bovine par un crible double hybride en levure. Cette méthode a permis d'identifier 63 protéines cellulaires impliquées dans des fonctions et des processus biologiques divers tels que le transport vésiculaire, l'exocytose, la polarisation et la différenciation des cellules épithéliales et neuronales. Parmi ces partenaires cellulaires, 28 ont été identifiés en banque d'ADNc humaine dont 19 sont communs aux deux virus et 35 ont été identifiés en banque d'ADNc bovine dont 15 sont communs au TBEV et au LIV. D'autre part, 7 interacteurs sur les 63 identifiés sont communs aux deux banques d'ADNc.

En parallèle, nous avons étudié l'effet de chaque protéine du TBEV et du LIV sur les voies d'induction et d'amplification de l'interféron, voie cellulaire majeure que les virus détournent en vue de promouvoir leur propre développement. La méthode employée a consisté à mesurer l'expression du gène codant la luciférase placée sous le contrôle des promoteurs de la voie en présence de chaque protéine virale. Ainsi, des profils différents d'inhibition ont pu être mis en évidence pour des protéines non structurales de ces deux virus. Les interactions identifiées seront validées de manière fonctionnelle sur modèles *in vitro* afin d'identifier leur effet sur le cycle viral. Par ailleurs, certaines interactions protéiques n'ont été identifiées qu'avec l'une des deux banques d'ADNc. S'il s'avère, après les vérifications expérimentales nécessaires, que ces interactions ne sont établies que dans un seul des contextes, humain ou bovin, celles-ci pourraient représenter des interactions ayant une spécificité d'espèce. De telles interactions pourraient expliquer les différences de pathogenèse induite par chacun des virus chez leur hôte mammifère cible. La caractérisation de telles interactions présenterait alors un intérêt majeur.

P18

Study of the interactions of Zika virus with the antiviral responses by experimental evolution

Vincent Grass¹, Elodie Décembre¹, Lee Sherry¹, Kassian Kobert², Alain Kohl³, Bastien Boussau², Marlene Dreux¹

¹ Centre international de recherche en infectiologie, CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École normale supérieure de Lyon, Univ Lyon, 69007, Lyon, France

² Laboratoire de biométrie et biologie évolutive (LBBE), CNRS UMR5558, Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL), France

³ MRC, University of Glasgow, Centre for Virus Research, Glasgow, Scotland, Royaume-Uni
<marlene.dreux@ens-lyon.fr>

Zika virus (ZIKV) infection causes neurological diseases and birth defects representing an important threat for human health. Recent studies demonstrated that interferon (IFN) response is pivotal for the control of ZIKV spread, its *in utero* transmission and protects against ZIKV-induced neurological diseases. To delineate the genetic interactions with the IFN response in ZIKV genome and the viral escape mechanisms, we conduct an unbiased genomic approach based on the study of the evolution of the entire viral quasi-species in response to experimental modulations of the host antiviral signalling. First, we set up an experimental cell culture system to exert a selective pressure on ZIKV replication by the Toll-like receptor (TLR)-3-induced antiviral signaling. We uncovered that cell culture pas-

saged ZIKV populations adapt to the antiviral response, as determined by viral resistance to TLR3-induced restriction, which occurs by 5 iterative passages of the viruses (i.e., using uninfected stably modified cell environment). We observed that passaged viruses no longer induce IFN response, as assessed by the absence of interferon-stimulated gene upregulation, concomitantly with an increased ability to replicate (approximately 10-fold as compared to input virus). The loss of activation of the host antiviral response is observed as early as 6 hours post-infection, thus suggesting that the passaged viruses might not be sensed by infected cells, and/or very rapidly prevent sensing by antiviral pathways through faster viral replication and attendant synthesis of inhibitory viral product(s). Importantly, to define the viral adaptations and hereby the molecular events leading to faster replication and escape from the host responses, we developed methods for high-resolution analysis of the viral evolution and reconstruction of viral genome haplotypes.

P19

Étude d'interactions entre GBF1 et les protéines du VHC

Nadjet Lebsir¹, Lucie Goueslain², Rayan Farhat¹, François Penin³, Jean Dubuisson¹, Catherine L Jackson², Yves Rouillé¹

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019, UMR 8204, CIIL Centre d'infection et d'immunité de Lille, 59000 Lille, France

² Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS, Université Paris Diderot Paris 7, 75013 Paris, France

³ Institut de biologie et chimie des protéines, UMR 5086, CNRS, Université de Lyon, 69000 Lyon, France

<yves.rouille@ibl.cnrs.fr>

GBF1 (*golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1*) a récemment émergé comme étant un facteur cellulaire essentiel à la réplication de plusieurs virus à ARN de polarité positive, dont le virus de l'hépatite C (VHC). Au cours du cycle viral du VHC, GBF1 est essentiel pendant une étape précoce de la réplication du génome viral, mais son mécanisme d'action est encore inconnu. Pour mieux comprendre comment GBF1 régule la réplication du VHC, nous nous sommes intéressés aux interactions possibles entre GBF1 et les protéines du virus. En utilisant une approche double hybride en levure, une interaction a été trouvée entre GBF1 et la protéine NS3, et plus précisément entre le domaine catalytique Sec7 de GBF1 et le domaine protéase de NS3 (NS3pro). Cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation en cellules HeLa. Dans le but de localiser le site d'interaction entre NS3pro et GBF1-sec7, nous avons isolé une série de mutants de NS3pro présentant une interaction réduite avec GBF1-sec7. Les expériences menées pour étudier l'impact de ces mutations sur la réplication et sur l'activité de la protéine NS3 nous ont permis de sélectionner une mutation affectant la réplication du VHC sans aucun impact sur l'activité de la protéase NS3. Le résidu muté étant situé à la surface de la protéine, cela suggère que le défaut de réplication pourrait être dû à une perte d'interaction avec GBF1, de manière directe ou indirecte. Une étude d'interaction *in vitro* des domaines GBF1-sec7 et NS3pro est en cours de réalisation afin de préciser la nature de cette interaction.

P20

Caractérisation d'inhibiteurs de kinases réprimant la réplication du virus de la rage

Zoe Lama, Yves Gaudin, Danielle Blondeau, Cécile Lagaudrière-Gesbert Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), Université Paris-Sud-Paris 11, CEA : DRF/I2BC, Université Paris-Saclay, CNRS UMR9198, Dept virologie, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif/Yvette cedex, France <cecile.lagaudriere@i2bc.paris-saclay.fr>

Le virus de la rage (RABV) (ordre des Mononegavirales, famille des *Rhabdoviridae*, genre *Lyssavirus*) est un virus neurotrope qui provoque une encéphalite fatale et est responsable de 59 000 décès humains par an. À

ce jour, seule la vaccination préventive ou post-exposition protège contre la maladie. Alors que les étapes du cycle viral sont plutôt bien décrites, les interactions du virus avec la machinerie cellulaire restent mal connues. Les voies de signalisation cellulaire, régulées par les kinases, jouent un rôle majeur dans la réplication de nombreux virus. Afin d'identifier les kinases de l'hôte nécessaires pour le cycle du RABV, le crible d'une banque d'inhibiteurs de kinases a été mis en œuvre. Deux molécules se sont révélées des inhibiteurs de l'infection RABV : la Tyrphostin 9 et la Rottlerin. L'étude des mécanismes d'action mis en jeu montre que la Tyrphostin 9 perturbe une étape très précoce de l'infection : la fusion virale car elle interfère avec l'acidification endosomale. Cet effet semble médié par l'action délétère de ce composé sur l'appareil de Golgi. En présence de Rottlerin, le cycle viral est inhibé au niveau de la synthèse d'ARN. À l'aide de siRNA, nous avons montré que cet effet de la Rottlerin est indépendant de la protéine kinase C δ , décrite comme la cible privilégiée de cet inhibiteur. Il a aussi été décrit dans la littérature que la Rottlerin peut jouer le rôle d'agent découplant mitochondrial. La comparaison de son effet avec celui d'un découplant mitochondrial classique, le CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone), montre que l'action inhibitrice de la Rottlerin repose sur cette fonction de découplant mitochondrial, qui conduit à une diminution du niveau d'ATP intracellulaire. Cette étude apporte un nouvel éclairage sur les interactions virus-hôte au cours de l'infection rabique et fournit des pistes d'investigation pour l'identification de cibles potentielles d'agents antiviraux.

P21

Criblage à haut débit d'ARN interférents identifiant de nouvelles cibles impliquées dans les mécanismes infectieux du virus de la rage

Regis Grailhe¹, Benoit Besson², Seonhee Kim¹, Florence Larrous², David Shum Shum¹, Herve Bourhy²

¹ Institut Pasteur Korea (IPK), 16, Daewangpangyo-ro 712 beon-gil Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-400 Rep. of Korea, Corée du Sud

² Institut Pasteur (IP), National Reference Centre for Rabies, WHO Reference Center for Reference and Research on Rabies, 25-28 Rue du Dr Roux, 75015 Paris, France
<herve.bourhy@pasteur.fr>

Le virus de la rage repose sur la machinerie cellulaire pour sa réplication tout en évitant la réponse immunitaire de l'hôte. Malgré son importance, on sait peu de choses sur les facteurs clés de l'hôte requis pour l'infection par le virus de la rage. Pour mieux comprendre le cycle infectieux du virus et découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques, nous avons effectué un criblage à haut débit d'ARN interférents sur des cellules humaines infectées avec un virus de la rage recombinant exprimant une protéine fluorescente. Tout particulièrement ciblé sur les kinases et phosphatases notre crible nous a permis d'étudier les gènes de la cellule hôte impliqués dans l'infection par le virus de la rage avant et après le cycle répliatif viral. Avec une lecture à 18 et 36 heures après l'infection, nous avons identifié 57 facteurs spécifiques de l'hôte essentiels pour le virus aux stades précoces de l'infection et 73 facteurs aux stades tardifs, dont 24 sont importants à tous les stades de l'infection. Parmi eux, les groupes de gènes des voies les plus importantes ont été déterminés, ce qui inclut les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) ainsi que le métabolisme du phosphatidylinositol. L'importance de ces voies a été validée en utilisant des molécules biologiquement actives pour ces cibles dans des neurones humains.

P22

DI-tector : un nouvel outil de détection des génomes viraux défectifs à partir de données de séquençage de nouvelle génération

Guillaume Beauclair^{1,2}, Marie Mura^{1,2,3}, Chantal Combredet^{1,2}, Frédéric Tangy^{1,2}, Nolwenn Jouvenet^{1,2}, Anastasia Komarova^{1,2}

¹ Unité de génomique virale et vaccination, Institut Pasteur de Paris, France

² CNRS UMR-3569, France

³ IRBA, France

<guillaume.beauclair@pasteur.fr>

Les génomes défectifs interférents (DI) sont des formes tronquées de génomes viraux générées par de nombreux virus lors de la réplication virale. Ils sont porteurs de propriétés immunostimulatrices du système immunitaire inné de l'hôte. Les DI partagent les caractéristiques minimales essentielles à leur réplication. Cependant, ils ne peuvent se répliquer en l'absence d'un génome viral complet fournissant les fonctions répliatives manquantes. Il existe trois classes principales de DI : i) ceux contenant une ou plusieurs délétions internes ; ii) ceux dits complexes ou mosaïques ; iii) ceux présentant une structure "panhandle" incluant les génomes "copy-back" et "snap-back". Les génomes "5' copy-back" générés pendant la réplication des paramyxovirus sont produits lorsque la polymérase virale se détache de la matrice génomique et se rattache au brin néoformé, entraînant ainsi une duplication complémentaire de l'extrémité 5' du génome viral donnant naissance à une structure en tige-boucle de type "panhandle". Plusieurs méthodes et outils bio-informatiques ont été proposés pour détecter les génomes DI à partir de données de séquençage de nouvelle génération. Elles permettent une détection robuste et sensible des génomes DI mosaïques ou contenant une/des délétions. Cependant, aucun de ces outils n'est capable de détecter de manière efficace les génomes "copy-back" et "snap-back". Nous avons développé un nouvel outil, "DI-tector", qui permet de détecter la présence de génomes viraux de type "panhandle" ou contenant des insertions/délétions à partir de données de séquençage de nouvelle génération. Avec cet outil, nous avons confirmé la présence de génomes "5' copyback" dans des cellules infectées par le virus de la rougeole. Nous avons également observé la présence d'un génome défectif de petite taille dont l'existence n'avait pas été détectée précédemment par des méthodes classiques de RT-PCR. L'existence de ce génome "5' copy-back" de 336 nucléotides a été confirmée par qPCR, validant la sensibilité de l'outil "DI-tector". Par ailleurs, l'analyse avec "DI-tector" de données de séquençage de préparations de virus Sendai a révélé que l'enrichissement en matériel viral augmentait la sensibilité de la détection de génomes DI. Nous proposons "DI-tector" comme un outil alternatif aux méthodes d'amplification par PCR et séquençages Sanger pour la détection de génomes DI.

P23

Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with severe gastroenteritis but not with in vitro infection

Laure Barbe¹, Beatrice Le Moullac-Vaidye¹, Nathalie Ruvoen-Clouet^{1,2}, Jacques Le Pendu¹

¹ Centre de recherche de cancérologie et d'immunologie, Nantes-Angers (CRCINA), Université d'Angers, Université de Nantes, Inserm U1232, 8 quai de Moncoussu, BP 70721 44007 Nantes cedex 1, France

² École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, Nantes, France

<laure.barbe@univ-nantes.fr>

Human strains of rotavirus A (RVAs) recognize fucosylated glycans of the histo-blood group family (HBGAs) through their spike protein VP8 and lack of these ligands due to HBGAs genetic polymorphism is associated with resistance to severe gastroenteritis caused by P[8] genotype RVAs. With the aim to delineate the contribution of HBGAs in the infection process, we analyzed the glycan specificity of VP8 proteins from various P genotypes. Binding to saliva of VP8 from P[8] and P[4] genotypes required expression both FUT2 and FUT3 enzymes, whilst binding of VP8 from the P[14] genotype required both FUT2 and A enzymes. We defined a glycan motif, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, recognized by P[6] clinical strains. Conversion into Lewis antigens by the FUT3 enzyme impaired recognition, explaining their lower binding to saliva of Lewis positive phenotype. In addition, the number of young healthy adults displaying

neutralizing antibodies to P[8] strains was associated with the presence of the FUT2 wild type allele. Nonetheless, *in vitro* infection of several susceptible cell lines was independent of HBGAs expression. Overall, the perfect match between results from saliva-based binding assays and the epidemiological data indicates that the polymorphism of human HBGAs controls susceptibility to RVAs, although the exact involved mechanism remains unclear.

P24

Rôle de la protéine Argonaute 1 dans l'expression du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

Sophie Goudey, Emmanuel Ségéral, Agathe Eckenfelder, Stéphane Emiliani, Sarah Gallois-Montbrun
Institut Cochin, CNRS UMR8104, Inserm U1016, Université Paris V-Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France
[<sarah.gallois-montbrun@inserm.fr>](mailto:sarah.gallois-montbrun@inserm.fr)

Les thérapies antivirales utilisées contre le VIH permettent de contrôler la réplication du virus et de diminuer la charge virale en dessous du seuil de détection. Cependant, dans certains types cellulaires comme les lymphocytes T CD4 quiescents, l'expression du génome viral peut être réprimée, le virus est alors dit latent et échappe aux traitements antiviraux. La latence du VIH est un processus multifactoriel : elle peut être due à une séquestration des facteurs de transcription, à l'établissement d'une structure répressive de la chromatine ou à la présence de marques épigénétiques répressives. Plusieurs études suggèrent également que la voie des microARNs (miARNs) et les protéines impliquées dans celle-ci pourraient participer au contrôle de la latence du VIH-1. Il existe quatre protéines Argonaute (Ago) chez l'homme, capables de s'associer à des miARNs et de constituer ainsi le cœur du complexe miRISC (*microARN Induced silencing complex*). Ce complexe régule l'expression d'environ 50 % des gènes cellulaires de manière post-transcriptionnelle. En plus de leur rôle cytoplasmique, Ago1 et Ago2 semblent impliquées dans des mécanismes nucléaires tels que l'épissage alternatif, la modification de la chromatine ou le contrôle de la transcription de gènes cellulaires. Nous avons récemment montré au laboratoire que Ago1 et Ago2 régulaient l'abondance des ARNm viraux multi-épissés, indépendamment de la voie des miARNs (Eckenfelder *et al*, *Nucleic Acids research* 2017). Afin de mieux comprendre le rôle des Ago et des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des miARNs, telles que Drosha et Dicer, dans le contrôle de l'expression virale, nous avons utilisé un modèle de cellules T dans lesquelles le virus intégré est latent (J-Lat). Le niveau d'expression du virus est mesuré grâce à un gène rapporteur codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur viral dans le contexte d'un mini-génome viral (J-Lat A1) ou du génome complet (J-Lat 10.6). La diminution de l'expression d'Ago1 par deux shRNA différents aboutit à une augmentation de la GFP dans les cellules J-Lat A1 et dans les J-Lat 10.6. Dans les J-Lat A1, cette augmentation est corrélée à une augmentation de la quantité de transcrits GFP, suggérant un rôle inhibiteur d'Ago1 soit dans la transcription du VIH-1, soit dans la stabilité des transcrits viraux. Une augmentation de la quantité de transcrits GFP et de leur expression est également visible lors de la répression d'expression de la protéine Drosha. En revanche, l'inhibition d'expression de Dicer ou d'Ago2 n'a pas d'effet sur l'expression du génome viral et des transcrits GFP suggérant que la voie des miARNs n'est pas impliquée. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, d'Ago1 et de la RNA polymérase II sont en cours afin d'explorer les mécanismes par lesquels Ago1 participe à la répression d'expression du VIH-1 dans ce modèle de cellules J-Lat.

P25

Interférence virale médiée par la protéine Rev du VIH-1

Alexandra Tauzin
Inserm U941, Hôpital Saint-Louis, Inserm, 1 avenue Claude Vellefaux, Paris, France
[<alexandra.tauzin@inserm.fr>](mailto:alexandra.tauzin@inserm.fr)

Les virus utilisent diverses stratégies afin de prévenir la réinfection des cellules productivement infectées, phénomène appelé interférence virale. Ces mécanismes ont pour objectif d'éviter un stress additionnel aux cellules déjà infectées, qui pourrait induire leur mort. Dans le cas du VIH-1, il a été montré que les protéines virales Env, Nef et Vpu ont un rôle dans l'interférence virale. En effet, elles entraînent une diminution de l'expression à la surface cellulaire des récepteurs ciblés par le virus, empêchant ainsi une surinfection. En plus de ces mécanismes, notre équipe a récemment décrit le rôle de Rev dans l'interférence contre le VIH-1. Nous avons observé que celle-ci s'établit de manière significative 18 heures après l'infection et est indépendante des récepteurs du VIH-1. Notre étude vise à caractériser le mécanisme d'interférence impliquant Rev. Pour cela, nous avons mis au point un système expérimental dans lequel une lignée lymphocytaire a été transduite par un vecteur codant le gène viral *rev* ou un des mutants déficients dans un des domaines fonctionnels de Rev (localisation, dimérisation, liaison à l'ARNv, trans-dominant négatif). Ces cellules sont ensuite infectées par le VIH et le niveau d'interférence est mesuré. Pour valider l'expression de Rev dans ces cellules, nous les avons infectées avec un virus déficient pour Rev. Dans les cellules exprimant Rev, on observe que l'infection se propage contrairement aux cellules exprimant une protéine Rev non fonctionnelle. La fonctionnalité des mutants de Rev a été testée par mesure de la production virale (en ng de p24) suite à la complémentation du virus Δ Rev. L'infectiosité des particules virales produites a également été mesurée.

Au cours du cycle naturel du VIH, l'expression de certaines protéines virales est dépendante de Rev. Dans nos cellules exprimant Rev, nous mesurons après infection à la fois l'expression d'une protéine réprimée précocement et indépendamment de Rev et d'une protéine exprimée tardivement et dépendante de Rev. Nous avons choisi d'étudier l'expression de la protéine HSA (*Heat Stable Antigen*), la séquence ayant été clonée à la place du gène *nef* (précoce), et l'expression de la protéine Gag (tardive). Lorsque les cellules cibles expriment Rev, on observe une réduction du nombre de cellules exprimant HSA et Gag d'environ 30 à 40 % par rapport aux cellules exprimant une protéine Rev non fonctionnelle. Cela confirme que Rev réduit la susceptibilité à l'infection et montre que l'interférence n'est pas liée au rôle physiologique de Rev dans la régulation de l'expression des protéines virales. Nous cherchons maintenant à identifier l'étape du cycle répliatif inhibée par Rev. L'étude de l'inhibition de l'infection par différents mutants de Rev nous renseignera sur les domaines fonctionnels de Rev nécessaires pour l'interférence. Sur la base de ces résultats, nous testerons l'implication des cofacteurs de Rev en modulant leur expression par ARN-interférence. Ce projet fera progresser notre compréhension de l'interaction entre le VIH-1 et les cellules cibles, en particulier concernant la protéine Rev et son implication dans les mécanismes d'interférence virale.

P26

Co-évolution de la syncytine-A, protéine fusogène d'origine rétrovirale, et de son récepteur Ly6E chez les *Muroidea*

Anne Dupressoir, Agathe Bacquin, Manon Vavasseur, Cécile Vernochet, Thierry Heidmann
CNRS UMR9196, Physiologie et pathologie moléculaires des rétrovirus endogènes et infectieux, Institut Gustave Roussy (IGR), 114, rue Edouard-Vaillant 94805 Villejuif cedex, France, France
[<anne.dupressoir@gustaveroussy.fr>](mailto:anne.dupressoir@gustaveroussy.fr)

Les syncytines sont des protéines d'enveloppe codées par des rétrovirus endogènes, acquises indépendamment au cours de l'évolution dans plusieurs branches de mammifères et capables de provoquer la fusion des membranes cellulaires via leur interaction avec un récepteur membranaire spécifique. Le génome de la souris possède deux gènes de syncytine, *syncytine-A* et *syncytine-B*, nécessaires à la formation du syncytiotrophoblaste placentaire et à la survie embryonnaire (Dupressoir *et al*, 2005, 2009, 2011). Ces deux gènes sont présents chez tous les *Muroidea*, *i.e.* souris, rat, hamster, gerbille, rat-taube aveugle (spalax), etc., indiquant que leur intégration a eu lieu il y a plus de 40 millions d'années (Vernochet *et al*,

2014). En 2017, le criblage d'une banque de cDNA de cerveau de souris, combiné à un test de fusion, a permis à notre laboratoire d'identifier le récepteur spécifique de la Syncytine-A de la souris (Bacquin *et al.*, 2017). Il s'agit d'une protéine à ancre GPI, induite par les interférons, LY6E. Cette protéine est fortement surexprimée dans plusieurs types de tumeurs chez l'homme, et a été identifiée comme facteur de susceptibilité à diverses infections virales. L'identification du récepteur de la Syncytine-A ouvre maintenant la voie à une étude originale visant à évaluer les modalités de la co-évolution de la *syncytine-A* et de son récepteur *LY6E*, et à identifier les déterminants moléculaires de leur interaction. En pratique, nous nous employons : i) à caractériser les forces évolutives qui ont agi sur les gènes *LY6E* et *syncytine-A*, via l'analyse *in silico* des variations site à site et branche à branche du ratio dN/dS ; ii) à tester la conservation de l'interaction fonctionnelle Syncytin-A/LY6E chez les différents Muroidea ; et iii) à identifier les déterminants moléculaires et les sites d'interaction entre la Syncytine-A et son récepteur via la production de protéines chimériques et à la mutagenèse dirigée. Les résultats déjà obtenus permettent de proposer un schéma évolutif qui sera présenté.

P27

« Conflit génétique » entre le récepteur NTCP et les hepadnavirus : implication sur la pathogénicité et le spectre d'hôtes de ces virus chez les primates et les chauves-souris

Stéphanie Jacquet^{1,2}, Ariel de Bernardo, Corinne Régis¹, François-Loïc Cosset^{2,3}, Lucie Etienne^{2,3}, Dominique Pontier^{1,2}

¹ Laboratoire de biométrie et biologie évolutive (LBBE), Université Claude Bernard Lyon 1, Institut national de recherche en informatique et en automatique, CNRS UMR5558, 43 bld du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

² LabEx Ecofect (ANR-11-LABX-0048) de l'Université de Lyon, Université de Lyon, Université Lyon 1, France ³ Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), École normale supérieure Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm U1111, CNRS UMR5308, 21 avenue Tony Garnier 69365 Lyon cedex 07, France
<dominique.pontier@univ-lyon1.fr>

Le virus de l'hépatite B (VHB), membre des hepadnavirus, affecte plus de 250 millions de personnes dans le monde. Chez les primates non-humains et les chauves-souris, principaux réservoirs mammifères des hepadnavirus, la pathogénicité de ces virus reste inconnue. Dans le cas d'une co-évolution hôte-virus, les virus pathogènes peuvent impacter l'évolution du génome de leur hôte. Plus particulièrement, les interactions moléculaires entre virus pathogènes et protéines de l'hôte (tel que le récepteur) peuvent conduire à des « courses aux armements » génétiques, identifiables par des signatures de sélection positive. La protéine NTCP (*sodium taurocholate cotransporting polypeptide*) sert de récepteur pour l'entrée du VHB dans les hépatocytes. Dans cette étude, nous déterminons si l'évolution du récepteur NTCP chez les primates et les chauves-souris a été façonnée par les hepadnavirus, et utilisons cette inférence comme un *proxy* pour comprendre : (i) la pathogénicité des hepadnavirus chez les mammifères ; et (ii) les conséquences de cette co-évolution sur leur spectre d'hôtes. Pour cela, nous avons analysé des séquences de NTCP nouvellement obtenues chez des espèces de primates (22 sp.) et de chauves-souris (13 sp.). Nos analyses évolutives de NTCP ont mis en évidence des signatures de sélection positive locales mais différentielles entre primates et chauves-souris. En particulier, les régions de NTCP en interaction avec le VHB ont évolué très rapidement au cours de l'évolution des primates. Ceci témoignerait d'une « course à l'armement » entre le NTCP et le VHB, suggérant que les hepadnavirus ont impacté négativement la *fitness* des primates au cours de leur évolution. En revanche, chez les chauves-souris, les régions supposées d'interaction avec le VHB ne montrent aucune signature de sélection positive significative. Ces résultats suggèrent que les hepadnavirus ne sont pas une pression de sélection pour les chauves-souris, et donc peu ou pas pathogènes. Une autre hypothèse possible est que les hepadnavirus des chauves-souris se fixent sur d'autres sites du récepteur NTCP. Dans l'ensemble, NTCP constitue une barrière génétique pour la transmission

inter-espèces des VHB chez les primates. Chez les chauves-souris, cette contrainte, si elle existe, serait moins importante, facilitant les phénomènes de transmission inter-espèces.

P28

Modèles d'infection pour étudier l'impact de la variabilité génotypique de la protéine Core du virus de l'hépatite C sur la biogenèse et la morphologie des gouttelettes lipidiques

Emeline Simon¹, Stephanie Aicher¹, Matthieu Fritz¹, Brigitte Blumen¹, Philippe Roingeard², Claire Gondeau³, Annette Martin¹

¹ Institut Pasteur, Paris, CNRS UMR3569, Université Paris Diderot Sorbonne Paris-Cité, France

² Université François Rabelais, Tours, Inserm U966, Faculté de Médecine, France

³ Institut de médecine régénératrice et de biothérapie, Institut de médecine régénératrice et de biothérapie, Hôpital Saint-Éloi, Inserm U1183 Montpellier, France

<emeline.simon@pasteur.fr>

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) conduit au développement d'une pathologie chronique responsable d'une détérioration progressive du foie qui peut se traduire par l'apparition de troubles métaboliques tels que la stéatose, une accumulation anormale de triglycérides sous la forme de gouttelettes lipidiques (GL) dans les hépatocytes. Les étapes de réplication génomique et de morphogénèse du VHC ont pour particularité une association étroite avec le métabolisme lipidique de la cellule hôte, pouvant être liée à une modification du profil lipidomique des cellules infectées et contribuant ainsi aux troubles métaboliques viro-induits. Le VHC présente une forte diversité génétique à l'origine de 6 génotypes majeurs. Des études cliniques suggèrent une évolution variable des manifestations cliniques selon les génotypes, notamment une association fréquente du génotype 3 du VHC avec la stéatose. Afin d'évaluer l'impact de la variabilité génotypique du VHC sur l'induction de la stéatose et d'en comprendre les mécanismes, notre étude s'est focalisée sur la protéine de capsid (Core) du VHC. Core est responsable de l'encapsidation du génome viral et a été décrite comme jouant un rôle potentiellement important dans la perturbation des voies métaboliques. Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer si les dérèglements métaboliques associés à l'infection par le VHC étaient induits de façon génotype-spécifique par Core, en ayant recours à des systèmes d'infection pertinents en culture cellulaire. Pour atteindre cet objectif, nous avons dans un premier temps généré des virus recombinants intergénotypiques à partir d'une souche de sous-type 2a hautement répliquative en culture cellulaire, exprimant les protéines Core d'isolats cliniques de génotypes variés, éventuellement associés à différentes signatures de stéatose micro- ou macro-vésiculaire. Nous avons obtenu des virus intergénotypiques hautement infectieux en culture de cellules hépatocytaires Huh7.5, montrant que les séquences de Core des différents génotypes sont parfaitement compatibles avec les éléments viraux du génotype 2a pour aboutir aux interactions nécessaires à la morphogénèse virale. Les capacités répliquatives et infectieuses des différents recombinants ont été comparées par mesure d'une activité rapportrice luciférase codée par les ARN viraux. Des cinétiques de production virale dans des cultures de cellules Huh7.5 infectées seront présentées pour les différents recombinants. Nous avons ensuite évalué l'impact des différentes séquences de Core sur la biosynthèse et la morphologie des GL par des méthodes d'analyses quantitatives par microscopie confocale. Nos résultats ont révélé que la protéine Core tend à s'associer aux GL les plus volumineuses, suggérant qu'elle induit leur agrégation dans une zone polarisée de la cellule infectée. Nous avons également mis en évidence une augmentation significative du volume moyen des GL dans les cellules infectées par les recombinants exprimant Core de sous-types 3a ou 2a par rapport aux cellules non infectées. Afin d'étendre ces analyses à des cultures primaires d'hépatocytes humains, le modèle d'infection *ex vivo* le plus pertinent, nous déterminons tout d'abord les profils d'infection comparés des virus recombinants intergénotypiques dans ces cultures primaires. Cette étude permettra de déterminer si des signatures moléculaires

de Core sont associées de façon spécifique au développement de perturbations du métabolisme lipidique.

P29

Effet délétère du virus Usutu sur les cellules nerveuses humaines

Sara Salinas, Jonathan Barthelemy, Philippe Van De Perre, Vincent Foulongne, Yannick Simonin
UMR 1058, Centre de Recherche Inserm, Université de Montpellier, France
<sara.salinas@inserm.fr>

Au cours de la dernière décennie, le nombre de *Flavivirus* émergents décrit a considérablement augmenté. Parmi eux on distingue les virus Zika (ZIKV) et Usutu (USUV). Suite aux épidémies récentes, le ZIKV a fait l'objet d'études intensives permettant de mieux appréhender la physiopathologie de ce virus. La pathogenèse du virus Usutu reste de son côté largement inexplorée. La circulation de l'USUV en Afrique a été documentée il y a plus de 50 ans et a émergé récemment en Europe, provoquant une mortalité massive de certaines populations aviaires. Plus récemment, l'USUV a été décrit comme étant associé à des troubles neurologiques chez l'homme tels que des encéphalites et des méningo-encéphalites. Le but de notre étude est d'évaluer la capacité de ce virus à infecter les cellules neuronales. Nos résultats indiquent que le virus Usutu infecte efficacement les neurones, les astrocytes, les microglies et les cellules souches neuronales humaines dérivées d'IPSc. En comparaison avec ZIKV, USUV aboutit à un taux d'infection plus élevé associé à une production virale, une mort cellulaire et une réponse antivirale plus importantes. Notre étude met en évidence la nécessité de mieux caractériser la physiopathologie liée à l'infection USUV afin d'anticiper la menace potentielle d'émergence de ce virus.

P81

Differential effects of SUMO1 and SUMO3 on PKR activation and stability

Faten El Asmi, Ghizlane Maarifi, Mohamed-Ali Maroui, Laurent Dianoux, Mounira Chelbi-Alix
Inserm UMR-S 1124, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France
<mounira.chelbi-alix@parisdescartes.fr>

Double-stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase (PKR) is a serine/threonine kinase that exerts its own phosphorylation and the phosphorylation of the α subunit of the protein synthesis initiation factor eIF-2 α . PKR was identified as a target of SUMOylation and the triple PKR-SUMO deficient mutant on Lysine residues K60-K150-K440 has reduced PKR activity. We report that SUMO1 and SUMO3 expression exert differential effects on PKR localization, activation and stability. SUMO1 or SUMO3 did not alter the repartition of PKR in the cytoplasm and the nucleus. However, in SUMO3-expressing cells, PKR was found more concentrated around the perinuclear membrane and was recruited from small speckles to nuclear dots. Interestingly, SUMO1 expression alone resulted in PKR and eIF-2 α activation, whereas SUMO3 reduced PKR and eIF-2 α activation upon viral infection or dsRNA transfection. In addition, encephalomyocarditis virus (EMCV) enhanced PKR conjugation to SUMO1 and SUMO3 but only SUMO3 expression promoted caspase-dependent EMCV-induced PKR degradation. Furthermore, the higher EMCV-induced PKR activation by SUMO1 was correlated with an inhibition of EMCV. Importantly, SUMO1, by inducing PKR activation in the absence of viral infection, and SUMO3, by counteracting both PKR activation and stability upon viral infection, shed a new light on the differential effects of SUMO-modified PKR.

P82

Infection non cytopathique d'une lignée cellulaire issue de l'appareil reproducteur mâle par le virus de l'artérite virale équine

Lydie Martin-Faivre¹, Delphine Gaudaire¹, Claire Laugier¹, Hélène Bouraïma-Lelong¹, Stéphan Zientara², Aymeric Hans¹
¹ Laboratoire de pathologie équine de Dozulé, Anses, Goustranville 14430 Dozulé, France
² Virologie UMR1161 (VIRO) INRA UR1161, École nationale vétérinaire d'Alfort, Anses, ENVA Maisons-Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle 94704 Maisons-Alfort cedex, France
<aymeric.hans@anses.fr>

Le virus de l'artérite virale équine (EAV) appartient au genre Equartevirus de la famille des Arteriviridae, au sein de l'ordre des Nidovirales. Ce virus peut provoquer l'avortement des juments gestantes et la mort des nouveau-nés. Suite à la primo-infection, le virus peut persister dans l'appareil reproducteur de certains étalons, mais les mécanismes permettant cette persistance restent peu connus. Afin d'établir un modèle *in vitro* d'infection non cytopathique par l'EAV, plusieurs lignées issues de l'appareil reproducteur mâle ont été testées. Nos résultats indiquent que l'infection par l'EAV est cytopathique pour les cellules 92BR (cellules d'âne) et DDT1 MF-2 (cellules de hamster), et moins cytopathique pour les cellules PC-3 (cellules d'homme) ; les cellules ST (cellules de porc) semblent éliminer le virus de la culture cellulaire ; les cellules LNCaP (cellules d'homme) et GC-1 spg (cellules de souris) ne sont pas permissives à l'infection ; alors que les cellules TM3 (cellules de souris) le sont en absence d'effets cytopathiques majeurs. L'infection des cellules TM3 par l'EAV pourrait donc permettre l'étude des relations hôte-pathogène et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la persistance de l'EAV dans l'appareil reproducteur des étalons.

P95

Comparaison des propriétés phénotypiques des glycoprotéines d'enveloppe de variants précoces et tardifs du VIH-1 circulant au sein d'un cluster de transmission

Maxime Beretta¹, Alain Moreau, Mélanie Bouvin-Pley, Asma Essat, Cécile Goujard, Marie-Laure Chaix, Laurence Meyer, Francis Barin, Martine Braibant
¹ Inserm U1259, Université François Rabelais, 10 boulevard Tonnellé, BP 3223 37032 Tours cedex 1, France

L'étude de la transmission sexuelle du VIH-1 a révélé que le plus souvent un seul ou un nombre limité de variants viraux parmi ceux présents chez le donneur étaient transmis à l'individu receveur. Il en résulte une population virale génétiquement très restreinte en début d'infection, par opposition à celle retrouvée chez les sujets chroniquement infectés très hétérogène. Le but de notre étude était de comparer les propriétés biologiques des glycoprotéines d'enveloppe de variants du VIH-1 circulant pendant la phase précoce et tardive d'infection au sein d'un cluster de transmission. Notre hypothèse était que si les variants transmis ont un avantage sélectif lors de la transmission, les enveloppes des virus retrouvés au stade précoce d'infection devraient partager des propriétés biologiques uniques. Un cluster de transmission de 4 patients infectés par des virus de sous-type B, pour lesquels des prélèvements précoces (< 3 mois) et tardifs (18 ou 24 mois post-contamination) étaient disponibles, a été identifié au sein de la cohorte ANRS Primo. Pour chaque patient, nous avons généré des virus pseudo-typés exprimant les enveloppes représentatives de la population virale les infectant au stade précoce (virus précoces) et tardif (virus chroniques). Nous avons observé que les virus précoces des 4 patients utilisaient exclusivement le corécepteur CCR5, alors que les virus chroniques de 2 des 4 sujets étaient capables d'utiliser les 2 co-récepteurs CCR5 et CXCR4. Les virus précoces étaient plus sensibles que les virus chroniques aux anticorps largement neutralisants PGT121 et 10-1074 ciblant la boucle V3 d'interaction au co-récepteur, ainsi qu'au peptide inhibiteur M48U1 ciblant le site d'interaction au CD4. À l'inverse, ils étaient plus résistants au peptide inhibiteur de fusion T20. Ces observations pourraient refléter une meilleure capacité des virus précoces à interagir et fusionner avec leurs cellules cibles. L'analyse des enveloppes de variants précoces et tardifs du

VIH-1 circulant au sein d'un cluster de transmission nous a permis de comparer l'évolution de virus très proches génétiquement chez 4 patients différents. Malgré des dates de contamination espacées de 15 mois entre le premier et le dernier patient, avons observé que les enveloppes des virus précoces possèdent un profil unique de sensibilité à certains anticorps neutralisants et inhibiteurs d'entrée, comparé aux virus chroniques, suggérant une évolution commune du virus chez 4 patients différents.

P96

Trafic intracellulaire de la protéine M du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)

Anabelle Perrier, Ariane Bonnin, Anne Goffard, Jean Dubuisson, Sandrine Belouzard

Centre d'infection et d'immunité de Lille (CIIL), Université de Lille, sciences et technologies, Institut Pasteur de Lille, Inserm, IFR142 : U1019, Université de Lille, droit et santé, CNRS UMR8204, 1 rue du professeur Calmette, BP 245, Lille cedex 59019 France

Le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) a émergé en 2012 dans la péninsule arabique et causé à ce jour une épidémie de 2143 cas causant 750 morts. Parmi les quatre protéines structurales du virus, la protéine d'enveloppe M est considérée comme le moteur de l'assemblage des particules virales. C'est une protéine à trois

domaines transmembranaires, avec un domaine N-terminal court et un long domaine C-terminal, constituant la moitié de la protéine. La protéine M des coronavirus est capable lorsqu'elle est exprimée seule en cellules de dépasser le site d'assemblage, le ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*). Nous avons confirmé que la protéine M du MERS exprimée seule dans des cellules est localisée au niveau du Trans-Golgi Network (TGN). Nous avons identifié dans le domaine C-terminal de la protéine deux signaux impliqués dans son trafic intracellulaire : un signal DxE d'export du réticulum endoplasmique (RE), et un signal GxYR de rétention dans le TGN. En effet la mutation de ce signal GxYR en alanine entraîne la délocalisation de la protéine vers la surface cellulaire. Afin de confirmer son rôle dans la rétention de la protéine M au niveau du Golgi, nous avons réalisé des chimères entre la protéine M du MERS et la protéine M du coronavirus IBV (*Infectious Bronchitis Virus*) pour laquelle il a été montré que le premier domaine transmembranaire est impliqué dans sa rétention intracellulaire au niveau du cis-Golgi et du ERGIC (*Machamer et al, 1993*). Les résultats obtenus suggèrent que pour IBV-M et pour MERS-M c'est le domaine C-terminal de la protéine qui est déterminant pour la localisation des protéines. En effet, la protéine IBV-M avec le domaine C-terminal de la protéine MERS-M est localisée dans le TGN tandis que la protéine MERS-M avec le domaine C-terminal de la protéine IBV-M est localisée dans le compartiment ERGIC. Un rôle du premier domaine transmembranaire est peu probable, mais une coopération entre les différentes régions de la protéine n'est pas à exclure.