

Interactions virus-cellule - session II Réplication et fonctions cellulaires

Judi 23 mars 15 h 45-17 h 00

Modérateurs : Nolwen Jouvenet et David Padeloup
Communications orales O16 à O21
Affiches P1 à P29, P81, P82, P95, P96

O16

Estrogen receptor R1 and CAD are host factors for hepatitis delta virus replication and antiviral targets

Eloi Verrier¹, Amélie Weiss², Charlotte Bach¹, Laura Heydmann¹, Laurent Mailly¹, Thomas Garcia³, Patrick Pale³, Catine Schuster¹, Camille Sureau⁴, Mirjam Zeisel¹, Laurent Brino², Thomas Baumert^{1,5}

¹ Université de Strasbourg, Inserm, Institut de recherche sur les maladies virales et hépatiques UMRS 1110, 67000 Strasbourg, France

² Plateforme de criblage haut-débit, Illkirch, France, IGBMC, France

³ Laboratoire de synthèse, réactivité organique et catalyse, Institut de Chimie, UMR 7177 CNRS, Université de Strasbourg, 4 rue Blaise Pascal, 67070, Strasbourg, France

⁴ Laboratoire de virologie moléculaire, Paris, France, Institut national de la transfusion sanguine [Paris], France

⁵ Institut hospitalo-universitaire, Pôle hépato-digestif, Nouvel Hôpital civil, 67000 Strasbourg, France

<thomas.baumert@unistra.fr>

Background and Aims. Hepatitis D virus (HDV) is a small, circular DNA virus co-infecting hepatocytes with HBV and requiring HBV envelope proteins to produce infectious particles. Chronic hepatitis B/D results in more severe liver disease and an increased risk of liver cancer compared to HBV mono-infection and is considered as the most severe form of viral hepatitis. To date, licensed HDV-specific therapies are absent and novel antiviral strategies are expected to improve patients' outcome and cancer risk.

Method. Taking advantage of the HDV-susceptible NTCP-overexpressing Huh-106 cell line, we combined a dual high-throughput screening approach to identify new host factors as antiviral targets for HDV infection. First, we applied a high-throughput loss-of-function screen using a siRNA library targeting more than 7000 druggable genes to identify hepatocyte factors required for HDV infection. Next, we performed a small molecule screen to identify anti-HDV compounds using the Prestwick library comprising 1200 FDA-approved drugs.

Results. The loss-of-function screen identified 202 host factor candidates for HDV infection. Validation studies identified *ESR1* (estrogen receptor E1) and *CAD* (trifunctional protein carbamoylphosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase) as a host factor pathway playing a key role in host cell pyrimidine biosynthesis. Interestingly, Fulvestrant, an antagonist of the estrogen receptor 1 (*ESR1*) was identified in the small molecule screen as an efficient inhibitor of HDV infection. On the other hand, the treatment of Huh-106 cells with *ESR1* agonists or modulators, such as Norgestimate or Toremifene induced an increase in HDV infection, confirming the relevance of *ESR1* for HDV replication. Kinetic assays revealed that *ESR1* mediates the early steps of HDV replication. Moreover, the antiviral effect of the Fulvestrant was associated with a decrease in *CAD* expression, which is known to be induced by the *SP1/ESR1* complex. Robust antiviral activity of the *CAD* inhibitor PALA in both Huh-106 and primary human hepatocytes confirmed the role of *CAD* as antiviral target.

Conclusion. Using a combined small molecule and loss-of-function screening approach we identified *ESR1* and *CAD* as host factors for HDV replication and novel targets for antiviral therapy. Our approach opens the door to new therapeutic strategies targeting host-dependency factors for HDV cure.

O17

Identification d'un nouveau mécanisme d'interférence du virus de la rage avec la fonction neuronale : importance de la protéine de matrice

Chloé Scordel¹, Maximilian Eizinger¹, Florence Larrous², Hervé Bourhy², Karl Klaus Conzelmann¹

¹ Max von Pettenkofer-Institute and Gene Center, LMU München, Allemagne

² Unité dynamique des Lyssavirus et adaptation à l'hôte, Institut Pasteur de Paris, France

<scordel@genzentrum.lmu.de>

Le virus de la rage, virus neurotrope de la famille des *Rhabdoviridae*, représente toujours un mystère quant à son interaction avec le système nerveux. L'infection naturelle est associée à de dramatiques dégâts neurologiques mais n'induit paradoxalement que peu de pertes neuronales, suggérant une atteinte du fonctionnement neuronal plutôt que des dommages structuraux. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, nous nous intéressons à l'interférence du virus rabique avec les récepteurs aux neurotrophines (NTR), ceux-ci participant à la régulation de la fonction neuronale. De plus, p75NTR, un des NTR, interagit avec la glycoprotéine virale et promeut le transport rétrograde des particules virales le long des axones. En utilisant des cellules de neuroblastome murin (N2A), nous montrons que l'infection par la souche vaccinale SAD entraîne la déplétion progressive, mais totale, de sortiline, une protéine transmembranaire formant un complexe avec p75NTR, l'expression de ce dernier n'étant pas affectée. Ensuite, l'absence d'effet d'un virus recombinant dépourvu de la protéine de matrice M (SAD-ΔM) indique que M est nécessaire à la déplétion de sortiline. M s'avère de plus suffisante, comme le montre la déplétion dose-dépendante observée en présence de M seule. Enfin, en utilisant un virus recombinant, exprimant le gène de la protéine M du virus sauvage THA (SAD-MTHA), nous montrons que ce mécanisme est partagé par les protéines M de différentes souches virales. Sortiline, en plus de sa fonction de NTR, régule le relargage de vésicules extracellulaires, comme les microvésicules ou les exosomes. Nous nous sommes donc ensuite intéressés à la composition du milieu extracellulaire de cellules N2A infectées ou non par SAD. Nos résultats préliminaires montrent que sortiline est fortement enrichie dans le milieu extracellulaire de cultures infectées, suggérant que le virus rabique induit la sécrétion massive de vésicules extracellulaires, contenant sortiline, résultant en sa déplétion du milieu intracellulaire. Afin de comprendre les conséquences de ce mécanisme pour les neurones, nous étudions actuellement l'effet des souches SAD et THA sur des neurones dérivés de cellules souches embryonnaires de souris. Grâce au système Crispr/Cas9, nous avons récemment pu établir des neurones KO afin de les comparer aux neurones sauvages. Tant par ses fonctions de régulateur du trafic intracellulaire que de récepteur à la surface des neurones, sortiline joue un rôle important dans le fonctionnement neuronal comme l'indique l'association d'un défaut dans ses fonctions à des maladies neurologiques humaines. Le phénomène que nous mettons en évidence pourrait donc participer aux dégâts neuronaux observés *in vivo* et représenterait un nouveau mécanisme par lequel un virus neurotrope altère le fonctionnement neuronal.

O18

Recrutement spatio-temporel des protéines virales et cellulaires durant le cycle infectieux du bactériophage SPPI

Audrey Labarde¹, Lina Jakutyte², Silvia Ayora³, Prishila Ponien⁴, Eric Jacquet⁴, Cyrille Billaudeau⁵, Rut Carballido-Lopez⁵, Paulo Tavares¹

¹ Département de virologie, Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), CNRS UMR9198, Bât. 14B, 1 avenue de la terrasse 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

² Unité de virologie moléculaire et structurale, CNRS UPR3296, Bât. 14B, 1 avenue de la terrasse 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

³ Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Bio-

tecnología, CSIC, 28049 Madrid, Spain, Espagne

⁴ Institut de chimie des substances naturelles (ICSN), CNRS UPR2301, avenue de la terrasse 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

⁵ Micalis, INRA (INRA) : UMR1319, F-78352 Jouy-en-Josas, France
<audrey.labarde@i2bc.paris-saclay.fr>

Pendant la longue co-évolution des virus et des cellules, les virus ont toujours trouvé un moyen efficace de détourner la machinerie cellulaire à leur avantage pour leur multiplication et leur dissémination. Le modèle d'étude est le bactériophage SPP1, aujourd'hui bien caractérisé, capable d'infecter la bactérie Gram-positif, *Bacillus subtilis*. Les premières études de PCR quantitative ont montré que plus de 300 copies du génome viral étaient synthétisées durant les 25 premières minutes suivant l'infection par le phage. Ces copies d'ADN se localisent dans un espace bien défini du cytoplasme bactérien appelé *foci* de réplication. Cette étape requiert le recrutement massif des ressources cellulaires de l'hôte orchestré par l'hélicase virale gp40 (Wang *et al.*, 2008 ; Martínez-Jiménez *et al.*, 2002) connue pour interagir notamment avec la primase dnaG et la sous-unité tau de l'ADN polymérase dnaX. Leur présence dans le *focus* de réplication quelques minutes après l'infection suggère que la machinerie est complètement redirigée pour une réplication efficace de l'ADN du bactériophage. De plus, nos études sur la formation du virion ont montré, pour la première fois, une compartimentation claire et indépendante de la réplication du génome et de l'assemblage, plus tardive, de la particule virale. Ce stockage des particules virales est principalement retrouvé de part et d'autre du foyer de réplication. Cette structuration spatiotemporelle met en évidence un programme séquentiel des interactions moléculaires, confiné à des localisations précises dans le cytoplasme bactérien, menant ainsi à la formation de près de 150 particules virales par cycle d'infection. Le virus exploite donc de façon très efficace les machineries cellulaires et l'architecture de la bactérie pour une multiplication optimale.

Q19

Étude de la régulation de l'expression des protéines de l'estomac d'*Aedes aegypti* lors de l'infection par le virus de la fièvre jaune

Lucie Danet¹, Guillaume Beauclair¹, Michèle Berthet², Valérie Choumet², Frédéric Tangy¹, Nolwenn Jouvenet¹

¹ Génomique virale et vaccination, Institut Pasteur de Paris, France

² Unité environnement et risques infectieux, Institut Pasteur de Paris, France

<nolwenn.jouvenet@pasteur.fr>

Les Arbovirus sont des virus circulant entre les hôtes vertébrés et leurs vecteurs arthropodes. Ces virus doivent franchir différentes barrières dans l'organisme du vecteur pour pouvoir être transmis au vertébré lors du repas sanguin *via* la salive. L'étape de dissémination du virus hors de l'estomac est une étape cruciale pour atteindre les organes secondaires, et en particulier les glandes salivaires. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires mis en place dans l'estomac du moustique *Aedes aegypti* infecté par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune (YFV-Dakar), nous avons mené une étude protéomique sur des estomacs de moustiques infectés. Nous avons tout d'abord caractérisé la réplication et la production des particules infectieuses dans les différents organes de moustiques infectés à plusieurs temps post-infection, par des méthodes de RT-qPCR et de titration virale. Nous avons ainsi démontré que le virus se dissémine efficacement dans les organes secondaires du vecteur (pattes, ailes et glandes salivaires) et ce à partir du 7^e jour suivant l'infection. Des foyers infectieux répartis dans tout l'estomac ont pu être mis en évidence par immunofluorescence. L'analyse protéomique comparant des estomacs infectés pendant 7 jours par le virus et des estomacs non infectés a été réalisée sur des échantillons constitués de 8 demi-estomacs. L'expérience a été répétée 3 fois de manière indépendante. Les échantillons ont été passés en spectrométrie de masse avec la méthode *Label-Free*, et les données analysées grâce au logiciel MaxQuant, permettant la détection différentielle de 2700 protéines. La comparaison des protéomes obtenus pour les organes infectés avec ceux des organes non-infectés révèle une modulation de la synthèse protéique. La présence du virus YFV-Dakar provoque l'augmentation de l'expression de 92 protéines et la diminution de l'expression de 73 pro-

téines. Nous avons par la suite sélectionné 40 candidats, avec pour critère une expression régulée de plus d'un facteur 4 ou bien détectées seulement dans un type d'échantillon. Certaines protéines, telles que Cactus ou UBR4, ont été décrites par d'autres méthodes dans le cadre d'infection par d'autres flavivirus. D'autres protéines n'ont pas été associées à une infection par flavivirus mais joueraient potentiellement un rôle dans l'infection de l'estomac par YFV. La validation du rôle de ces candidats sur la réplication virale dans des cellules d'*Ae. aegypti* est en cours. Des études fonctionnelles chez le moustique seront ensuite effectuées grâce à des techniques de "silencing". Nous espérons pouvoir caractériser des facteurs impliqués dans l'infection et la dissémination du virus de la fièvre jaune dans son vecteur *Ae. aegypti*. Ces données contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes de la barrière intestinale, qui pourront participer à la conception de mesures de protection contre la dissémination d'arbovirus.

O20

CP-RTD : une nouvelle protéine du virus 2 de l'asperge ?

Nina Lukhovitskaya¹, John Carr², Andrew Firth¹

¹ Department of Pathology, Division of Virology, University of Cambridge, Royaume-Uni

² Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Royaume-Uni
<aej24@cam.ac.uk>

Le virus 2 de l'asperge (*Asparagus virus 2*, AV2) appartient au genre des *Ilarvirus* et à la famille des *Bromoviridae*. Son génome est constitué de trois ARN monocaténaux à polarité positive et qui sont encapsidés dans des particules quasi-sphériques. Le génome de l'AV2 possède 5 cadres de lecture ouverts. L'ARN 1 code la protéine 1a qui consiste en deux domaines méthyl-transférase et hélicase. L'ARN 2 code la protéine 1b qui possède un domaine ARN polymérase ARN-dépendante. 1a et 1b forment ensemble le complexe de réplication viral. L'ARN 3 code la protéine de mouvement MP et la protéine de capsid CP, cette dernière étant exprimée par l'intermédiaire d'un ARN subgénomique, l'ARN 4. CP est une protéine multifonctionnelle : en plus de la formation des particules virales, elle est impliquée dans la réplication et le mouvement viraux. La capacité particulière qu'a la CP des *Ilarvirus* à initier l'infection *via* des interactions avec l'extrémité 3' des ARN génomiques est nommée « activation génomique ». En utilisant des techniques de génomique comparative, nous avons trouvé que la séquence codante de CP (24 kDa), qui se termine par un codon stop ambre, est suivie par une extension dans le même cadre de lecture, le domaine *readthrough* (RTD -5,4 kDa). Ce domaine est présent chez deux sous-groupes d'*Ilarvirus* et est soumis à une forte sélection négative (purificatrice), ce qui semble indiquer qu'il code un peptide fonctionnel. Le domaine RTD contient également un motif à doigt de zinc qui est conservé. Pour évaluer expérimentalement l'existence de CP-RTD (29,4 kDa) et étudier ses possibles fonctions, nous avons créé un clone infectieux d'AV2 et trouvé des hôtes expérimentaux adéquats. Grâce à une analyse mutationnelle, nous avons montré que les mutations qui abolissent la production de CP-RTD diminuent l'infectivité d'AV2 et limitent la diffusion du virus. En utilisant des techniques de fractionnement de tissus et de microscopie confocale, nous avons également montré que CP-RTD est localisée dans le noyau. Chez d'autres virus de plantes à génome à ARN monocaténaux à polarité positive, une signification fonctionnelle à la localisation nucléaire a été montrée pour des protéines qui sont impliquées dans le mouvement à longue distance, la suppression du *RNA silencing* et/ou la modulation de l'expression de gènes de l'hôte. La localisation nucléaire, ainsi que le fait que CP-RTD possède un motif à doigt de zinc, pourraient indiquer que le(s) rôle(s) de CP-RTD au cours de l'infection virale soi(en)t basé(s) sur des interactions nucléaires avec de l'ADN et/ou de l'ARN. Nous travaillons actuellement à la découverte des fonctions de CP-RTD.

O21

Étude des gènes précoces du bactériophage T5 : identification des gènes viraux responsables de la prise de contrôle des fonctions cellulaires de l'hôte

Luis Ramirez¹, Pascale Boulanger², Ombeline Rossier^{2,3}

¹ *Bactériophage T5, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), University Paris-Saclay, Université Paris-Sud, CNRS, CEA, Bât. 430, rue du doyen Georges Poitou 91400 Orsay, France*

² *Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), UMR9198, CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UMR9198, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France*

³ *Max von Pettenkofer Institute, University of Munich, Allemagne*
<pascale.boulanger@i2bc.paris-saclay.fr>

T5 est un bactériophage lytique qui infecte *Escherichia coli*. C'est le seul phage connu qui injecte son génome en deux étapes. Après la fixation du phage sur son récepteur, seulement 8 % de l'ADN viral est injecté dans la bactérie et le transfert du génome est stoppé. Les gènes précoces codés par l'ADN injecté sont alors rapidement exprimés : ils inactivent les systèmes de défense bactériens, détournent les machineries de biosynthèse et déclenchent la dégradation massive du génome de l'hôte. Quelques minutes après, le reste du génome (92%), comprenant les gènes intermédiaires et tardifs, est transféré dans la bactérie. En raison de ce mécanisme en deux étapes, T5 est un modèle privilégié pour étudier le rôle des gènes précoces dans la prise de contrôle des fonctions cellulaires de l'hôte. La région des gènes précoces comprend 16 gènes. Jusqu'à présent, seuls deux d'entre eux, A1 et A2, ont été identifiés comme essentiels pour l'infection. L'expression d'A1 et A2 est nécessaire pour la reprise du transfert et l'injection complète du génome de T5. Par ailleurs, nous venons de montrer que A1 est une DNase qui est probablement responsable de la dégrada-

tion du génome bactérien, alors que A2 est un régulateur transcriptionnel. Cependant, on ne sait pas si les autres gènes précoces sont essentiels et leur fonction n'est pas connue. L'alignement des génomes des phages de la même famille que T5 montre que, en plus de A1 et A2, six gènes précoces sont très conservés: T502, 05, 07, 10, 13, 14. Nous évaluons actuellement la fonction de ces gènes inconnus en utilisant deux approches : (i) l'étude des effets de la délétion du gène sur le processus d'infection ; et (ii) l'étude de l'impact de la surexpression du gène phagique chez l'hôte. Pour la première approche, il était nécessaire de développer une méthode efficace de construction et sélection de mutants de T5 : nous avons optimisé le système CRISPR/Cas9 pour cribler des mutants T5 obtenus par recombinaison homologue et nous avons amélioré les rendements jusqu'à 20 % (par rapport à 0,2 % avec la méthode classique). Les mutants T5 portant une délétion des gènes 02 ou 05 ont ainsi été obtenus, montrant que ces gènes ne sont pas essentiels pour l'infection dans des conditions de laboratoire. Nous étudions actuellement leur impact sur la cinétique de l'infection T5 et sur la production virale. Par la deuxième approche, nous avons montré que la surexpression du gène 05, mais pas des gènes 02 ou 07, inhibe la croissance d'*E. coli*. Ces résultats suggèrent que le produit du gène T505, une protéine transmembranaire putative, bien que non essentielle pour l'infection, est toxique pour l'hôte. Cette étude sera étendue à l'ensemble des gènes précoces encore inconnus afin de déterminer le nombre minimal de gènes impliqués dans la prise de contrôle des fonctions de l'hôte et d'identifier leur fonction. Ce type de démarche présente un intérêt majeur pour la recherche et le développement de nouveaux agents anti-bactériens.