

Structure-fonction, morphogénèse

Jeu­di 28 mars, 14 h 00-15 h 15

Modération : Aurélie Albertini, Jean-Marie Bourhis
Communications orales O6 à O10
Affiches P46 à P55, P140, P141

O6

Transitions de phase et formation de structures de type amyloïde par une protéine virale : un nouveau mécanisme de toxicité cellulaire induite par un virus

Edoardo Salladini¹, Claire Debarnot¹, Vincent Delauzun¹, Cyrille Mathieu², Branka Horvat², Maria-Grazia Murrall³, Priscila Sutto-Ortiz¹, Silvia Spinelli¹, Roberta Pierattelli³, Christophe Bignon¹, Sonia Longhi¹

¹ Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB, UMR 7257), Aix-Marseille Université-AMU, CNRS Marseille, France

² Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), CIRI, Inserm, U1111, Université Claude-Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École normale supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon, France

³ Magnetic Resonance Center (CERM), Via Sacconi 6, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italie

<sonia.longhi@afmb.univ-mrs.fr>

Les Henipavirus sont des agents zoonotiques de classe 4 responsables d'encéphalites aigües létales chez l'homme. Leur protéine non structurale V joue un rôle clé dans l'évasion de la réponse immunitaire innée de l'hôte. Nous avons précédemment caractérisé d'un pont de vue biophysique les protéines V des Henipavirus et montré qu'elles interagissent avec DDB1, une protéine cellulaire qui est un composant du complexe d'ubiquitine ligase E3. Nous avons ensuite découvert que la protéine V du virus Hendra subit une transition de phase liquide-hydrogel. En combinant des approches expérimentales et bioinformatiques, nous avons identifié la région de V responsable de ce phénomène. Cette région (appelée PNT3) fait partie de la longue région intrinsèquement désordonnée de la protéine V. Nous avons approfondi l'étude de cette région désordonnée d'un point de vue biophysique et structural. Des essais de liaison à la Thioflavine T et au rouge Congo, ainsi que des études de microscopie électronique à coloration négative, ont montré que cette région forme des structures supramoléculaires de type amyloïde enrichies en structure β . Des expériences de coloration au rouge Congo indiquent que de telles structures sont également formées dans des cellules de mammifère transfectées pour exprimer la protéine PNT3 et dans des cellules infectées par le virus Hendra. Les cellules transfectées pour exprimer la protéine PNT3 présentent également une viabilité réduite en présence d'un agent de stress. De manière intéressante, les cellules de mammifère exprimant un variant non amyloïdogénique de PNT3 conçu de manière rationnelle (PNT33A) sont beaucoup moins sensibles à l'agent de stress, ce qui permet d'établir un lien entre la formation de fibrilles et la toxicité cellulaire. Ces résultats suggèrent que la capacité des protéines P/V à former des fibres de type amyloïde pourrait constituer un des mécanismes moléculaires expliquant la pathogénicité de ce virus et sa capacité à induire des encéphalites.

O7

Recruitment and subversion of the autophagic machinery into the viral assembly compartment of the cytomegalovirus improve the formation of mature infectious particles

Clémence Taisne¹, Marion Lussignol¹, Eva Hernandez¹, Arnaud Moris², Lina Mouna^{1,3}, Audrey Esclatine¹

¹ Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), Université Paris-Sud-Paris 11, CEA : DRF/I2BC, Université Paris-Saclay, CNRS UMR9198 Gif/Yvette, France

² Center for Immunology and Microbial Infections (CIMI-Paris), U1135, Inserm, UPMC, CNRS, 91, Bd de l'Hôpital 75013 Paris, France

³ Centre hépato-biliaire (CHB), Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Paul Brousse, Inserm U1193, Université Paris XI -Paris Sud, Villejuif, France

<audrey.esclatine@u-psud.fr>

Autophagy is an evolutionary conserved self-eating vesicular process, allowing degradation and recycling of cellular components. We previously demonstrated that Human cytomegalovirus (HCMV) tightly modulates autophagy, in particular by blocking the final degradation step. This modulation notably leads to an accumulation of LC3, an important component of the autophagic machinery. We established several autophagy-deficient human fibroblastic cell lines, by knocking down expression or activity of ATG4B, ATG5, BECN1 or LC3B, different essential autophagy genes, and we demonstrated that the autophagic machinery exerts a beneficial effect on HCMV production. Using different approaches to discriminate when in the viral cycle autophagy is acting, we observed that autophagy has no role on HCMV entry in fibroblasts, on viral DNA replication or on exocytosis. However, we demonstrated by 3D reconstruction confocal microscopy that LC3-positive vesicles were localized within the viral assembly compartment (vAC). The vAC is a juxtannuclear structure containing several organelles and membranes, where assembly and final envelopment of HCMV particles occur. Two LC3 homologs, GABARAPL1 and GATE16, also accumulated during HCMV infection and were observed associated with the vAC, in proximity with fragmented Golgi stacks. LC3 and its homologs can be lipidated thanks to a cellular ubiquitin-like conjugation system and we observed an association of the lipidated forms with the vAC. Using electron microscopy, we identified these structures associated with vAC as phagophores and autophagosomes. Additionally, we demonstrated the formation of a pre-assembly compartment (PrAC) in infected cells, which precedes the vAC and consists of a juxtannuclear ring-shape structure containing both fragmented Golgi and LC3-positive vesicles. Finally, we purified extracellular viral particles and we showed that various autophagy proteins, such as LC3, GABARAPL1 and BECN1 were found in mature virions. Our results thus suggest that the autophagic machinery participates to the final cytoplasmic envelopment of HCMV viral particles into the vAC and can be packaged within the virions.

O8

La paire activateur-effecteur ABHD5-ATGL puise dans les réserves de triglycérides des gouttelettes lipidiques pour la production du virus de l'hépatite C

Gabrielle Vieyres, Thomas Pietschmann

Twincore-Center for Experimental and Clinical Infection Research, Feodor-Lynen-Str. 7, 30625 Hannover, Allemagne

<gabrielle.vieyres@twincore.de>

Le virus de l'hépatite C (HCV) circule dans le sang sous forme d'une particule lipo-virale, constituée de protéines virales et d'éléments des lipoprotéines de l'hôte. Pour assembler ce virion atypique, le HCV usurpe des facteurs cellulaires impliqués dans le métabolisme des gouttelettes lipidiques et la synthèse des lipoprotéines. Nous avons précédemment identifié la colipase ABHD5/CGI-58 (α/β hydrolase domain containing protein 5) comme nouveau cofacteur de l'HCV. Son rôle est de mobiliser les stocks de triglycérides des gouttelettes lipidiques pour la production de la particule lipo-virale (Vieyres *et al*, *PLoS Pathogens* 2016). Le but de cette nouvelle étude était l'identification de la lipase activée par ABHD5 et responsable de ce phénotype. Bien qu'ATGL (adipose triglyceride lipase) soit un effecteur connu d'ABHD5, sa pertinence dans la lipolyse des gouttelettes lipidiques hépatiques est controversée. Ici, nous confirmons l'expression d'ATGL dans les hépatocytes primaires humains et les lignées dérivées d'hépatomes. La manipulation de l'expression d'ATGL par interférence ARN ou expression lentivirale, ou de son activité en exprimant le peptide inhibiteur endogène G0S2 reproduit les effets observés lorsque l'on cible ABHD5: typiquement, l'activité d'ATGL corrèle avec la lipolyse des gouttelettes lipidiques et avec l'efficacité de l'assemblage viral. ABHD4 est une protéine apparentée à ABHD5 mais incapable d'activer ATGL.

L'expression de mutants gains de fonction d'ABHD4, qui lui confèrent la capacité d'activer ATGL, compensent la déplétion d'ABHD5, soulignant la coopérativité entre ABHD5 et ATGL. De plus, nous testons actuellement des mutants d'ATGL responsables d'une anomalie de stockage des lipides neutres chez l'homme. Ces mutants sont incapables de dégrader les gouttelettes lipidiques dans notre lignée cellulaire hépatocytaire et nous évaluons leur effet sur l'assemblage de l'HCV. En conclusion, nos nouveaux résultats identifient ATGL comme une lipase régulant la mobilisation des triglycérides dans les hépatocytes et le partenaire d'ABHD5 pour puiser les lipides de cet organelle vers la particule virale naissante.

O9

Caractérisation de l'assemblage et du désassemblage des protéines de la capsid du virus de l'hépatite B

Maelenn Chevreuil¹, Lauriane Lecoq², Laetitia Poncet¹, Sonia Fieulaine³, Karen Perronet⁴, Thomas Zinn⁵, Eric Jacquet⁶, Naima Nhiri⁶, Stéphane Bressanelli³, Guillaume Tresset¹

¹ Laboratoire de physique des solides (LPS), CNRS : UMR8502, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay Orsay, France

² Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (MMSB), Institut de biologie et chimie des protéines (IBCP), Université Claude-Bernard Lyon 1 (UCBL), CNRS : UMR5086 Lyon, France

³ Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), Université Paris-Sud-Paris 11, CEA: DRF/I2BC, Université Paris-Saclay, CNRS UMR9198, Gif/Yvette, France

⁴ Institut d'optique Graduate School (IOGS), CNRS, Palaiseau, France

⁵ European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) Grenoble, France

⁶ Institut de chimie des substances naturelles (ICSN), CNRS UPR2301, Gif-sur-Yvette, France

<maelenn.chevreuil@u-psud.fr>

<guillaume.tresset@u-psud.fr>

Malgré de nombreux travaux consacrés aux cycles de vie des virus, il n'existe actuellement aucun modèle physique décrivant les chemins dynamiques via lesquelles les protéines s'autoassemblent autour d'un génome pour former la capsid virale. L'objectif est d'élucider ces chemins dynamiques d'assemblage et de désassemblage de la capsid du virus de l'hépatite B (VHB). La protéine native de la capsid du VHB (HBV Core) est un polypeptide composé de 183 résidus comprenant un domaine d'assemblage (NTD, résidus 1-149) et un domaine de liaison à l'acide nucléique (CTD, résidus 150-183). Le NTD est nécessaire et suffisant pour l'auto-assemblage de 120 sous-unités en capsides icosaédriques où chaque sous-unité correspond à un dimère de protéine. Le CTD est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec l'ARN et l'encapsulation dans la capsid. La diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS), associée à des variations de la force ionique et d'effet chaotrope, nous a permis de sonder les processus d'assemblage et de désassemblage des capsides vides (uniquement les NTD). Le criblage de thermo-stabilité par fluorescence nous permet, quant à lui, de sonder la force des interactions entre les protéines. Aujourd'hui, nous développons de la microscopie de fluorescence à réflexion interne totale (TIRFM), associées à protéines natives (NTD + CTD) marquées chimiquement par fluorescence, afin d'étudier l'encapsulation de l'ARN pré-génomique. Ensemble, nos données nous permettent de caractériser les états de transition pour l'auto-assemblage et le désassemblage de capsides virales vides ou pleines. Il serait remarquable de comprendre les mécanismes adoptés par le VHB pour assurer sa survie car c'est une étape clé pour promouvoir le développement d'inhibiteurs de l'emballage d'ARN pré-génomique contre le VHB.

O10

Imagerie de virus et bactéries infectieuses vivants par microscopie à force atomique

Sébastien Lyonnais, Nathalie Gros, Mathilde Hénaut, Christine Chable-Bessia, Delphine Muriaux

Centre d'étude des maladies infectieuses et pharmacologie anti-infectieuse (Cemipai), CNRS : UMS3725, Université de Montpellier, Montpellier, France

<sebastien.lyonnais@cemipai.cnrs.fr>

Chaque étape du cycle de vie d'un agent pathogène peut générer des modifications structurelles, morphologiques et mécaniques lui permettant d'être ou devenir infectieux. La microscopie à force atomique (AFM) est un outil particulièrement performant pour explorer ces aspects, tels que la morphologie des virus et des bactéries ainsi que leurs propriétés mécaniques, à l'échelle nanométrique et au niveau de l'entité unique. Les technologies les plus récentes permettent désormais le couplage d'un AFM à un microscope optique à fluorescence pour imager et analyser virus, bactéries et cellules infectées non fixés, *i.e.* vivants, dans un environnement liquide, avec des résolutions temporelles de plus en plus rapides. Nous avons installé en 2018 un tel combiné bio-AFM dans le laboratoire de biosécurité de niveau 3 de la plateforme régionale Cemipai, en complément d'un microscope équipé pour l'imagerie de super-résolution en PALM/STORM des cellules infectées vivantes. Nous présenterons dans cette communication la « customisation » de cet AFM pour l'imagerie en L3 et plusieurs exemples d'imagerie qualitative et quantitative par AFM et imagerie optique de virus (VIH, Chikungunya, grippe), bactéries et cellules infectées ; montrant les perspectives uniques de ce type de technologie pour apporter des informations nouvelles sur le cycle de vie des agents pathogènes et générer des mesures biophysiques jusqu'alors inaccessibles.

P46

Characterization of 263K microsomal fraction PrP^{Sc} assemblies and its relevance with regard to nanofiltration of plasma-derived products

Steve Simoneau¹, Danica Ciric², Angélique Igel-Egalon²,

Mohammed Moudjou², Bruno You³, Vincent Béringue²,

Human Rezaei², Benoit Flan¹

¹ DVSB, Laboratoire du fractionnement et des biotechnologies (LFB), Les Ulis, France

² Unité de recherche virologie et immunologie moléculaires (VIM), INRA UR0892, Université Paris Sud, Université Paris Saclay, Jouy-en-Josas, France

³ PESB, Laboratoire du fractionnement et des biotechnologies (LFB), Les Ulis, France

<simoneaus@lfb.fr>

Following the emergence of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in the United Kingdom (UK) in 1996, four incidents of human-to-human transmission of vCJD prions in recipients of transfused, non-leukoreduced red blood (RBC) concentrates from donors with pre-clinical vCJD have been described in the UK, providing evidence that vCJD is transmissible through transfusion. With regards to plasma-derived medicinal products, there is no confirmed evidence so far that these products can transmit vCJD, most likely due to the efficacy of manufacturing processes of these products in removing prion-associated infectivity. Among steps susceptible to reduce prion infectivity the efficacy of nanofiltration on 15, 20 or 35 nm pore size filters is debated with regards to uncertainties regarding the size of the agent that could potentially be present in plasma from vCJD incubating donors. The evaluation of the prion removal efficacy of plasma product manufacturing process steps is carried out through spiking experiments in small-scale studies in laboratory setting. These studies measure the reduction of a prion load voluntarily added to the tested product for the purpose of the study. The infectivity present in blood (and plasma) in prion diseases is low and its physicochemical nature is still unknown. These studies therefore use brain material from experimentally infected animals, which exhibit high infectious titers. The brain material is either used directly as brain homogenates, or in a more enriched form such as microsomal fraction to eliminate the infectivity associated with the largest cellular debris. Since the nature of the prion agent in blood is still undetermined today, the question of the relevance of the different spiking materials is still significant. To attempt to answer at least partly this question, the size and aggregation profiles of PrP^{Sc} assemblies in 263K microsomal fractions were determined using velocity sedimentation gradients and was related to infectivity (Bioassay) or templating activity [quantitative miniaturized bead-PMCA –(mb-PMCA)] data in these same fractions. The

results and analysis of these studies will be presented and discussed with regard to the efficacy of nanofiltration in eliminating small PrPS objects.

P47

Premières études de la structure de la protéine Tax du virus HTLV-1

Marie Dujardin¹, Louise Dubuisson², Francesca Fiorini¹, Sébastien Chevalier², Guy Schoehn³, Patrice Gouet¹, Renaud Mahieux², Christophe Guillon¹

¹ MMSB, Institut de biologie et chimie des protéines [Lyon] (MMSB), CNRS : UMR5086, Université Claude-Bernard Lyon 1 (UCBL), Lyon, France

² Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), Université Claude-Bernard Lyon 1, Inserm : U1111, ENS Lyon, Univ Lyon, Lyon 07, France

³ Institut de biologie structurale (IBS -UMR 5075), CEA DRF/IBS, CNRS UMR5075, Université Grenoble-Alpes, Institut de biologie structurale, Grenoble, France

<christophe.guillon@ibcp.fr>

Le virus humain T-lymphotrope de type 1 (HTLV-1) a été le premier rétrovirus oncogène humain à être découvert au début des années 1980. Depuis, trois autres membres de la famille du HTLV (HTLV-2 à -4) ont été décrits. HTLV-1 infecte aujourd'hui entre 5 et 20 millions d'individus dans le monde. Il est retrouvé dans des foyers de forte endémicité. HTLV-1 est l'agent étiologique de la leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte (ATLL), et de la paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM), une maladie neurologique chronique. L'infection par HTLV-2 a été corrélée avec une lymphocytose, mais n'a jamais été associée avec une maladie hématologique maligne. Les pathologies éventuelles induites par les virus HTLV-3 et -4 restent à découvrir. Outre les gènes structuraux canoniques gag-pol-env des rétrovirus, les HTLV codent plusieurs protéines régulatrices dont l'oncoprotéine Tax. Une des fonctions principales de Tax consiste à recruter la machinerie cellulaire transcriptionnelle au niveau du promoteur viral pour réguler l'expression virale. Tax est également impliquée dans la transformation cellulaire, puisqu'elle induit l'immortalisation de lymphocytes primaires humains *in vitro* par son interaction directe avec des facteurs de transcription cellulaires. Son pouvoir oncogène a été démontré *in vivo* en utilisant des modèles de souris transgéniques. La structure tridimensionnelle de Tax n'a toujours pas été élucidée. Sur la base d'expériences de dichroïsme circulaire sur des domaines isolés, certains auteurs ont suggéré que cette protéine contiendrait des domaines non ordonnés, mais aucune étude structurale poussée n'a jusqu'à présent été menée sur l'entière protéine Tax. Nous présentons ici nos premiers résultats d'expression et de caractérisation de la protéine Tax du virus HTLV-1. À ce jour, nous n'avons pas pu obtenir de données structurales par cristallographie aux rayons X malgré le criblage de milliers de conditions. C'est pourquoi des essais de co-expression de Tax avec des partenaires cellulaires, comme par exemple les facteurs de transcription CREB et RelA/p65, sont en cours. Ceci a pour but de permettre l'obtention de complexes homogènes et de tailles suffisantes qui seront ensuite étudiés par microscopie électronique et/ou cristallographie aux rayons X. L'obtention de données structurales sur Tax seule ou en complexe avec ses partenaires cellulaires permettra de caractériser les bases moléculaires des fonctions de Tax. Du fait des fonctions cruciales de Tax pour le cycle de réplication des virus HTLV, ceci pourrait permettre à terme le développement de stratégies de type « *drug design* » afin d'identifier une nouvelle classe de molécules visant à traiter l'infection par HTLV en inhibant les fonctions de Tax.

P48

Développement rationnel d'inhibiteurs de l'assemblage de la capsid du FIV

Mathieu Long¹, Natalia Sierra², Xavier Robert¹, Guzman Alvarez², Christophe Guillon¹

¹ MMSB, Institut de biologie et chimie des protéines (IBCP), CNRS : UMR5086, Université Claude-Bernard Lyon 1, Lyon, France

² CENUR Litoral Norte, Universidad de la Republica, Ruta 3 (km 363), Paysandú C.P. 60000, Uruguay

<mathieu.long@ibcp.fr>

<christophe.guillon@ibcp.fr>

Le virus de l'immunodéficience féline (FIV) est un rétrovirus causant, chez les espèces félines, un syndrome d'immunodéficience similaire à celui provoqué par le VIH chez l'homme. L'étude de ce virus représente un intérêt majeur pour la médecine vétérinaire des espèces domestiques comme des espèces sauvages. Comme tous les rétrovirus, le virus est constitué d'une matrice assemblée sous la membrane virale, contenant la capsid virale dans laquelle se trouve le génome viral lié à la nucléocapsid. La capsid est un assemblage conique de la protéine CA également appelée p24 ; cette protéine a la capacité de former des hexamères et pentamères s'assemblant en une capsid à forme dite « fullerène » qui est nécessaire à l'infectiosité du virus. La mise au point rationnelle d'inhibiteur de cet assemblage représente ainsi un intérêt majeur pour le développement de nouveaux traitements antirétroviraux. La structure d'un monomère de la protéine p24 du FIV a déjà été déterminée par l'équipe (Folio *et al*, 2017). Le laboratoire de molécules bioactives à l'Université Littoral Norte (Paysandú, Uruguay) dispose d'une chimiothèque à faible coût de production. Des tests d'assemblage capsidique *in vitro* en présence de ces molécules ont permis d'identifier une quarantaine de composés inhibiteurs de l'assemblage de la capsid. Des expériences de thermophorèse (*Microscale Thermophoresis*, MST) ont confirmé l'interaction de quatorze de ces molécules avec p24, avec des affinités de l'ordre de la centaine de micromolaire. Une expérience de docking de ces 14 inhibiteurs sur la structure monomérique de p24 a permis d'identifier un site de fixation préférentiel. Nous avons donc initié l'étude de la protéine p24 par RMN afin de préciser les bases moléculaires impliquées dans les interactions avec nos molécules tête de série. Par ailleurs, un criblage virtuel par docking a été effectué sur la structure de la protéine p24 monomérique contre environ 13 millions de molécules de la « ZINC database ». Ceci nous a permis de confirmer la fixation probable de nombreuses molécules sur le site de fixation précédemment identifié. La combinaison de ce criblage d'engorgement avec les données expérimentales de RMN sur les bases moléculaires des interactions protéine:inhibiteurs permettra d'optimiser les molécules tête de série que nous avons identifiées. En parallèle, notre second objectif est d'obtenir des cristaux de p24 sous formes pentamérique et/ou hexamérique afin de caractériser les interfaces d'interaction entre les sous-unités p24 et de concevoir rationnellement de nouvelles molécules ciblant spécifiquement cette interface. Comme cela a déjà été fait pour la capsid du VIH, nous avons généré des mutants de p24 pouvant établir des ponts disulfures entre les sous-unités de façon à stabiliser les multimères en vue d'une cristallisation puis des études par diffraction des rayons X. L'ensemble de ces travaux devraient permettre d'identifier des molécules candidates qui seront validées sur des virus répliquatifs *in vitro*. Ceci pourrait permettre la mise au point des traitements à bas coût pour les besoins de la médecine vétérinaire.

P49

Assemblage de capsides virales autour de nanoparticules d'or sondé par spectroscopie d'absorbance et diffusion des rayons X résolues en temps

Andrew Burke¹, Maelenn Chevreuil¹, Alisier Paris¹, Vanessa De La Grange¹, Claire Goldmann¹, Javier Pérez², Doru Constantin¹, Guillaume Tresset¹

¹ Laboratoire de physique des solides (LPS), CNRS : UMR8502, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France

² Synchrotron Soleil (SSoleil), CNRS URI, L'Orme des Merisiers Saint-Aubin, Gif-Sur-Yvette, France

<guillaume.tresset@u-psud.fr>

Les protéines de capsid virale ont la remarquable capacité de s'auto-assembler autour d'un cœur inorganique tel qu'une nanoparticule d'or. Les

nanoparticules d'or présentent un intérêt particulier du fait de nombreuses applications potentielles en photonique, électronique et médecine. Pour des applications biomédicales en particulier, il est crucial que les nanoparticules soient bien stabilisées, car leur aggrégation les empêche de diffuser à travers les tissus et raccourcit leur temps de vie dans l'organisme. Dans ce cadre, la capsidie formée par des protéines virales autour d'un cœur synthétique constitue un agent stabilisant efficace et biocompatible, ainsi même qu'une barrière protectrice pour l'organisme hôte. Comme exemples de développements récents, on peut citer que la diffusion sur la membrane cellulaire de nanoparticules d'or anisotropes couvertes de protéines de capsides virales a été suivie avec succès par microscopie optique en champ sombre, tandis que des nanoparticules d'oxyde de fer encapsulées dans des capsides virales ont été imagées en résonance magnétique à fort contraste dans des cellules cancéreuses. Dans la présente étude, nous avons combiné la spectroscopie d'absorbance et la diffusion des rayons X aux petits angles résolues en temps, pour élucider, à haute résolution spatiotemporelle, la dynamique d'auto-assemblage de protéines de capsidie virale autour de nanoparticules d'or fonctionnalisées. Les protéines provenaient du virus de la marbrure chlorotique de la cornille, un virus de plante T = 3 à ARN simple brin. Les nanoparticules d'or ont été choisies car l'adsorption de protéines est finement détectée par effet de résonance plasmon, et car la densité électronique de l'or est élevée, ce qui favorise la diffusion des rayons X. Nous avons élucidé un mécanisme en trois étapes : immédiatement après mélange, les protéines s'adsorbent sur les nanoparticules en moins d'une seconde. En cas d'excès de protéines, une partie des nanoparticules encapsidées s'agglomèrent durant la première heure pour former des agrégats amorphes de nanoparticules piégées dans une matrice protéique. Au cours des heures qui suivent, des nanoparticules encapsidées sont relarguées graduellement et les agrégats finissent par être entièrement dissociés. Une profonde compréhension des phénomènes d'assemblage et d'auto-organisation des systèmes viraux est devenue indispensable à la fois en virologie, et au développement de matériaux viro-inspirés.

P50

Une nouvelle enzyme cellulaire impliquée dans la protéolyse de la glycoprotéine du virus Ebola

Olivier Reynard, Neil Kearney, Viktor Volchkov
Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), Université Claude-Bernard Lyon I, Inserm, U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, Univ Lyon, Lyon, France
<olivier.reynard@inserm.fr>

L'entrée du virus Ebola est un processus à plusieurs étapes qui débute par la fixation des particules virales sur des molécules d'attachement à la surface cellulaire. Nos études ont permis l'identification d'une classe de molécules antivirales se liant à la glycoprotéine virale (GP) et inhibant cette étape. La génération de mutants d'échappements basés des virus VSV recombinant exprimant la GP du virus Ebola a permis d'obtenir des virus présentant une résistance trois fois supérieure à ces molécules antivirales. Fait notable, ces mutants présentaient dans leurs séquences des mutations induisant la protéolyse de la GP par une nouvelle enzyme cellulaire conduisant ainsi à une modification très probable de la structure de la protéine.

P51

Des facteurs protéiques sériques permettent la maturation des particules du VHC, et leur association avec apoB dans le milieu extracellulaire

Solène Denolly¹, Christelle Granier¹, Nelly Fontaine¹, Bruno Pozzetto², Thomas Bourlet², Maryse Guérin³, François-Loïc Cosset¹

¹ Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), École normale supérieure (ENS) Lyon, Université Claude-Bernard Lyon I (UCBL), CNRS : UMR5308, Inserm : U1111, Lyon 07, France

² Groupe immunité des muqueuses et agents pathogènes (GIMAP), Université Jean-Monnet [Saint-Etienne] : EA3064, France

³ Research Unit of Cardiovascular, Metabolism and Nutrition Diseases, Inserm, France
<flcosset@ens-lyon.fr>

Les particules du virus de l'hépatite C (VHC) sont détectées dans le sérum de patients infectés sous des formes hétérogènes de densité faible (< 1,08), soulignant ainsi leur lipodation via leur association avec des lipoprotéines contenant de l'apoB. Il a été proposé que cette association se produise au moment de l'assemblage ; cependant, les mécanismes restent mal définis et, curieusement, la majorité des particules du HCV obtenues en culture cellulaire (HCVcc) sont sécrétées avec une densité plus élevée (> 1,08) et ne sont pas ou faiblement associées à l'apoB. Nous avons produit des particules HCVcc de souches Jc1 ou H77 à partir de cellules dérivées d'hépatocarcinome Huh-7.5 cultivées dans des conditions standard avec 10 % de sérum de veau fœtal (FCS) ou dans des conditions sans sérum ou encore, avec du sérum humain (HS) avant d'analyser leurs profils de densité comparativement à du virus issu de patients. Par rapport aux conditions sans sérum ou avec FCS, la production en HS redistribue la plupart des particules infectieuses dans les faibles densités (< 1,08) voire dans les très basses densités (< 1,04). De plus, une incubation de courte durée avec du HS est suffisante pour déplacer les particules physiques de HCVcc dans les fractions de faible densité, de manière dépendante du temps et de la dose de HS, augmentant leur infectivité spécifique, favorisant l'association apoB et induisant une résistance à la neutralisation. Nous avons également découvert que les particules de VHC produites à partir d'hépatocytes humains primaires pouvaient également passer à une densité faible lorsqu'elles étaient incubées avec du HS. De plus, comparé à Jc1, nous avons détecté des niveaux plus élevés de particules infectieuses H77 HCVcc dans les fractions de très basse densité. En générant des mutants des souches virales Jc1 et H77, nous avons identifié la région hypervariable (HVRI) de la glycoprotéine E2 comme étant le facteur viral régulant la densité des particules. Enfin, les trois classes de lipoprotéines, à savoir les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), de basse densité (LDL) et de haute densité (HDL), peuvent induire de manière synergique un déplacement des particules du VHC vers les faibles densités ; cependant, cela nécessite un ou plusieurs facteur(s) sérique(s), de nature non lipidique incluant l'albumine. En conclusion, l'association des particules du VHC avec des lipides neutres peut se produire dans le milieu extracellulaire. Le niveau de lipodation dépend de la composition du sérum ainsi que des propriétés spécifiques de HVRI. Ces conditions de culture simples permettent la production de particules infectieuses du VHC ressemblant à celles de patients infectés de manière chronique.

P52

Structure des ARN génomiques du virus influenza A

Erwan Quignon¹, Damien Ferhadian¹, Valérie Vivet-Boudou¹, Hardin Bolte², Catherine Isel³, Redmond Smyth⁴, Martin Schwemmler², Roland Marquet¹

¹ Architecture et réactivité de l'ARN (ARN), CNRS : UPR9002, IBMC Strasbourg, France

² Institute for Virology, University Medical Center Freiburg, Freiburg, Allemagne

³ Unité génétique moléculaire des virus à ARN, Département de virologie, Institut Pasteur, CNRS UMR 3569, Institut Pasteur, Paris, France

⁴ Helmholtz Institute for RNA-based Infection Research, Würzburg, Allemagne
<erwan.quignon@gmail.com>

Les virus influenza A sont responsables d'épidémies et de pandémies grip-pales. Leur génome est constitué de huit segments génomiques ARN de polarité négative. Les ARN sont présents sous la forme de complexes ribonucléoprotéiques, s'enroulant autour d'un squelette protéique constitué de la protéine NP. Les segments sont de tailles différentes et chaque segment code au moins une protéine virale. On retrouve, à l'extrémité de chaque segment le complexe polymérase, constitué des protéines PB1, PB2 et PA. Un exemplaire de chaque segment doit être empaqueté afin d'obtenir une

particule virale qui soit infectieuse. Notre laboratoire cherche à déterminer quels sont les principes qui régissent l'emballage des ARN génomiques. De plus, la structure du génome facilite le réassortiment génétique lors de l'emballage. Ce mécanisme permet l'échange de segments génomiques entre différentes souches en cas de co-infection, ouvrant la possibilité à la génération de nouveaux virus hautement pathogènes. Il a pu être montré précédemment au laboratoire que des interactions ARN-ARN et ARN-NP sont impliquées dans le mécanisme d'emballage. Afin d'identifier les régions impliquées dans ces interactions, des techniques de cartographie chimique, SHAPE-MaP et DMS-MaPseq, sont utilisées en combinant différents réactifs. La première étape consiste à utiliser ces techniques en modifiant des ARN transcrits *in vitro*, nus ou complexés à la protéine NP. Les modifications sont détectées par des arrêts de la polymérase lors d'une étape de rétro-transcription. Trois réactifs complémentaires sont utilisés : le réactif IM7 permet la modification des riboses et les réactifs DMS et EDC permettent la modification des bases A/C et U/G, respectivement. La seconde étape va consister à appliquer ces techniques *in vitro* sur des particules virales complètes ou désassemblées, ainsi qu'à plusieurs souches mutantes. Les conditions de rétro-transcription utilisées permettront d'induire des mutations aux positions des nucléotides modifiés, qui seront détectées par un séquençage à haut-débit. Les premiers résultats obtenus sur la modification des ARN avec les différents réactifs seront présentés, ainsi que l'avancée sur les expériences *in vitro*. Ce projet devrait permettre de déterminer la structure des ARN génomiques au sein des particules virales entières ou désassemblées mais également les régions impliquées dans les interactions ARN-ARN et ARN-NP.

P53

Caractérisation fonctionnelle de l'activité méthyltransférase de la protéine L du virus de la rage

Wahiba Aouadi¹, Florence Larrous¹, Valentine Maire¹, Lauriane Kergoat¹, Coralie Valle², Etienne Decroly², Hervé Bourhy¹

¹ *Lyssavirus, épidémiologie et neuropathologie (LyEN), Institut Pasteur, Paris, France*

² *Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB), CNRS : UMR7257, Aix-Marseille Université, Faculté des Sciences de Luminy, Marseille, France*

<wahiba.aouadi@pasteur.fr>

La rage est une maladie mortelle chez l'homme et l'animal, due à un virus neurotrophique, le virus rabique (RABV). Elle représente une menace pour la santé publique, entraînant plus de 59 000 décès humain chaque année dans le monde. Le RABV appartient au genre des Lyssavirus, dans la famille des Rhabdoviridae, à l'ordre des Mononegavirales. C'est un virus enveloppé à ARN simple brin négatif non segmenté d'environ 12 kb qui code pour cinq protéines virales : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine matrice (M), la glycoprotéine (G) et la polymérase virale (L). La protéine L du RABV assure la synthèse des structures coiffées en 5' des ARN dont la structure 3D n'a pas encore été résolue. En revanche, celle du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), un virus apparenté (genre Vesiculovirus, famille des Rhabdoviridae), montre une organisation en trois domaines conservés portant les activités : i) ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) ; ii) de synthèse de la structure coiffe ; et iii) méthyltransférase (MTase). Les mécanismes de coiffage et de méthylation des ARN viraux jouent un rôle clé dans l'échappement à la réponse antivirale. En effet, les ARN viraux mal coiffés sont détectés par les senseurs cytoplasmiques de la cellule hôte induisant la neutralisation du virus. L'objectif de ce travail est de caractériser le domaine MTase de RABV et d'identifier les résidus essentiels impliqués dans cette activité. Pour cela, des mutations de résidus conservés sont introduites dans le domaine MTase de la protéine L. L'effet des différentes mutations a été étudié par un système de miniréplicon qui permet d'analyser la capacité du complexe viral (N, P et L) à transcrire et répliquer un gène rapporteur (CAT). Nos résultats indiquent que les mutations en position 1681 (T1681A, T1681I, T1681E et T1681S) induisent une augmentation de l'activité du complexe de réplication. En revanche, les mutations

du domaine catalytique K1686R, D1798N, K1830R et E1868N altèrent complètement l'activité du complexe de réplication. Nous avons également introduit ces mutations dans la séquence du génome d'une souche virale isolée d'un patient mordu par un chien en Thaïlande (Tha). Sept virus recombinants ont été produits par génétique inverse, Tha-LT1681A, Tha-LT1681S, Tha-LT1681E, Tha-LK1686R, Tha-LD1798N, Tha-L K1830R et Tha-LE1868N et ont été caractérisés. Les différents stocks viraux ont été contrôlés à différents passages, leur cinétique de croissance étudiée et leur diversité intrinsèque caractérisée par séquençage à haut débit (technologie Illumina). Certains mutants montrent une croissance semblable à celle du virus sauvage. Le séquençage haut débit de ces mutants nous a permis de montrer que certains présentaient une réversion partielle ou complète des mutations ou l'introduction de mutations compensatoires dont le rôle est en cours d'investigation. En revanche, certains mutants catalytiques montrent des cinétiques de réplication très ralenties par rapport au virus sauvage. En conclusion, nos résultats indiquent que le domaine catalytique K, D, K, E joue un rôle clé dans l'infection RABV, et l'introduction de mutation sur les résidus conservés entraîne l'adaptation du virus par la réversion et/ou l'apparition de mutations additionnelles entraînant parfois une réversion vers le phénotype sauvage.

P54

Des interactions PB2-PA impliquées dans la dimérisation de la polymérase virale limitent les possibilités de réassortiment génétique entre virus influenza A

Kuang-Yu Chen, Emmanuel Dos Santos Afonso, Nadia Naffakh, Catherine Isel

Unité génétique moléculaire des virus à ARN, Département de virologie (GMVR), CNRS : UMR3569, École doctorale BioSPC-Université Paris Diderot, 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

<nadia.naffakh@pasteur.fr>

<catherine.isel-griffiths@pasteur.fr>

La polymérase du virus influenza A (FluPol) est composée de trois sous-unités, PB2, PB1 et PA. Nous avons observé qu'un virus réassortant dont le segment PB2 dérive du virus A/WSN/33 (WSN) dans un fond génétique A/PR/8/34 (PR8) est atténué par rapport au virus PR8 sauvage, et ce malgré un degré d'identité de 97 % entre les protéines PR8-PB2 et WSN-PB2. Nous avons cherché à appréhender les bases moléculaires de cette incompatibilité génétique, avec pour objectif de mieux comprendre comment la sous-unité PB2 coopère avec les autres protéines virales. Après plusieurs passages en série du réassortant PR8xWSN-PB2, nous avons isolé un révertant phénotypique dont la capacité de réplication est proche de celle du virus PR8 sauvage. Par séquençage de nouvelle génération, nous avons détecté la présence d'une mutation sur la sous-unité PB2 (PB2-D701N) et de trois mutations extragéniques, PB1-M195T, PA-L28R et PA-E349K. Des virus porteurs de ces mutations, soit isolées soit en combinaison, ont été produits par génétique inverse. Leurs titres infectieux et les phénotypes de plages de lyse ont été comparés. L'accumulation des ARN-v, -m et -c dérivés du segment NP dans des cellules infectées à forte multiplicité d'infection a été mesurée par une RT-qPCR brin-spécifique. Enfin l'activité polymérase et l'activité de dimérisation des FluPol sauvages ou mutées ont été mesurées en utilisant un test mini-génome rapporteur pour la première, et un test de complémentation split-luciférase ou de co-immunoprécipitation pour la seconde. Nos données indiquent que l'acquisition par le virus PR8xWSN-PB2 des deux mutations PA-L28R et PA-E349K est suffisante pour restaurer un titre infectieux et un phénotype de plage de lyse proches de ceux du virus PR8 sauvage. Alors que de faibles niveaux d'ARN-v, -m et -c et d'activité FluPol sont mesurés pour le virus PR8xWSN-PB2 et pour les virus porteurs de chacune des mutations isolées, les niveaux mesurés en présence des deux mutations de PA sont proches de ceux mesurés pour le virus PR8 sauvage. Dans le test mini-génome, les effets d'une trans-complémentation avec une protéine PB2 mutée déficiente pour la seule activité de transcription ou la seule activité de réplication suggèrent que le réassortiment PR8xWSN-PB2 induit un défaut de synthèse de l'ANRv, qui est corrigé par les mutations PA-

L28R et PA-E349K. Enfin, le résultat des tests d'interaction FluPol-FluPol indiquent que les deux mutations de PA, exposées à la surface du trimère, affectent la dimérisation de FluPol, confortant ainsi le modèle selon lequel une FluPol entraine la synthèse d'ARNv. En conclusion, notre étude souligne le fait que les possibilités de réassortiment mettant en jeu les segments PB1-PB2-PA, même génétiquement proches, peuvent être limitées par le biais de la dimérisation de FluPol et du contrôle qu'elle exerce sur l'équilibre entre les activités de réplication et de transcription virales.

P55

Mise au point d'un minigénome pour le métapneumovirus humain et comparaison du rôle de M2-1 avec le virus respiratoire syncytial

Hortense Decool, Marie Galloux, Jean-François Eléouët
Unité de recherche virologie et immunologie moléculaires (VIM), INRA : UR0892, Centre de recherche de Jouy-en-Josas, Jouy-en-Josas, France
<jean-francois.eleouet@inra.fr>

Le virus respiratoire syncytial (VRS) et le métapneumovirus humain (hMPV) sont 2 agents responsables de maladies respiratoires sévères telle que la bronchiolite chez le nouveau-né. Ils posent également de sérieux problèmes chez les personnes âgées et les immunodéprimés. Le VRS et le hMPV sont deux virus enveloppés à ARN simple brin de polarité négative appartenant à la famille des Pneumoviridae. Ils codent respectivement pour 11 et 9 protéines (le hMPV ne possédant pas les protéines non-structurales NS1 et NS2). L'ordre des gènes est également légèrement différent. La protéine M2-1 du RSV est une protéine tétramérique de 22kDa. Elle agit comme cofacteur de transcription essentiel au fonctionnement du complexe polymérase (composé de la polymérase L, de la phosphoprotéine P et de la nucléoprotéine N). En absence de cette protéine, les gènes situés en aval ne sont pas transcrits. Depuis toujours, le rôle des protéines de hMPV a été défini par analogie avec les protéines du RSV. Or, il a été démontré que, pour hMPV, M2-1 n'est pas essentiel à la réplication de virus recombinants en cellules. Cependant, il reste indispensable à l'infection *in vivo* (Buchholz *et al.*, 2005). Son rôle n'est donc pas très clair. Un système minigénome est utilisé dans notre laboratoire afin de reproduire le complexe polymérase du VRS. Il se compose de plasmides codant les protéines N, P, M2-1 et L ainsi qu'un plasmide minigénome contenant deux gènes (minigénome bicistronique), le gène codant la luciférase du ver luisant (Firefly) et le gène codant la luciférase Gaussia. La mesure de l'expression de ces gènes nous permet d'évaluer l'activité du complexe polymérase en présence ou en l'absence de M2-1. Afin d'étudier plus précisément le rôle de M2-1 du HMPV, nous avons reproduit le même système pour ce virus. Alors que pour le RSV avec le même type de minigénome le deuxième gène n'est pas transcrit en l'absence de M2-1, celui du HMPV fonctionne à peine un peu moins bien qu'en présence de cette protéine. Le rôle exact de M2-1 reste donc à éclaircir pour le HMPV.

P140

Interaction de la protéine NS1 des virus influenza A avec l'ARN : mécanismes impliqués dans la reconnaissance spécifique

Daniel Marc¹, Alan Wacquié¹, Stéphane Goffinont², Virginie Nadan², Franck Coste², Emmanuel Kut¹, Bertrand Castaing²

¹ INRA, UMR1282, Infectiologie et santé publique, Institut national de la recherche agronomique, France

² UPR4301 CBM, CNRS Orléans
<alan.wacquier@inra.fr>

Les virus influenza demeurent un problème persistant en santé publique au niveau mondial. Notre arsenal thérapeutique actuel, limité à seulement deux molécules qui ciblent la neuraminidase virale, n'est pas à l'abri de résistances et doit donc être enrichi. Les virus influenza contournent les défenses cellulaires par la production de la protéine non-structurale 1 (NS1). Absente du virion, NS1 cible, entre autres, le système interféron de type I, limitant ainsi l'amorçage de la réponse antivirale. Bien connue pour ses interactions avec l'ARN, NS1 reconnaît des motifs conservés contenus dans les ARN de polarité positive dérivés du génome viral. L'invalidation du domaine de liaison à l'ARN (RNA-Binding Domain, RBD) par la double-substitution R38A-K41A réduit la multiplication virale et abolit la virulence (Trapp *et al.*, 2018). Une meilleure caractérisation des interactions moléculaires entre la protéine NS1 et l'ARN pourrait permettre, in fine, de développer de nouveaux inhibiteurs anti-influenza ciblant spécifiquement cette interaction. Nous avons récemment résolu la structure tridimensionnelle du RBD d'une NS1 d'un virus aviaire H7N1, en complexe avec un duplex palindromique d'ARN qui dérive d'ARN sélectionnés *in vitro* pour leur liaison à NS1. Des expériences de gel retard avec le RBD ont permis de démontrer la haute spécificité de ce duplex pour plusieurs variants du RBD (kD compris entre 0.82 et 3.5 nM). La double substitution R38A-K41A du RBD réduit d'environ 400 fois l'affinité, avec un impact encore plus important pour le RBD de l'allèle B de NS1. Des expériences de compétition en gel-retard nous ont permis de préciser les déterminants de l'interaction dans la molécule d'ARN, et en particulier l'importance du motif GUAAC dans le duplex ARN, un motif très proche du site canonique donneur d'épissage. Nos résultats indiquent que : i) un minimum d'un site GUAAC « accessible » est nécessaire pour permettre une interaction avec une haute affinité ; ii) la présence d'un second site GUAAC symétrique améliore légèrement l'affinité ; iii) les motifs de séquence caractéristiques des ARN viraux de polarité positive, mis en évidence par la sélection *in vitro*, ne semblent pas impliqués dans l'interaction spécifique avec le RBD ; iv) l'affinité d'interaction de notre duplex est supérieure d'un facteur 100 à celle d'un duplex non-spécifique que Cheng *et al.* (2009) avaient utilisé pour établir la structure d'un complexe RBD-ARN ; v) la double substitution R38A-K41A dans le RBD d'allèle A n'abolit pas complètement l'interaction, et le complexe reste cristallisable ; vi) sur le plan structural, les complexes RBD-ARN double-brin conservent la même géométrie globale, que les ARN soient ou non spécifiques, et les différences d'affinité semblent reposer uniquement sur des différences structurales subtiles.

P141

Structural and molecular bases of Integrase - viral RNA interaction during HIV-1 morphogenesis

Cecilia Rocchi¹, Julien Batisse², Daniela Lener³, Matteo Negroni³, Xavier Robert¹, Christophe Guillon¹, Marc Ruff², Patrice Gouet¹, Francesca Fiorini¹

¹ Institut de biologie et chimie des protéines (IBCP), CNRS, UMR5086, Université Claude Bernard-Lyon I Lyon, France

² Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg, Inserm : U964, CNRS : UMR7104, Illkirch, France

³ Architecture et réactivité de l'ARN, Institut de biologie moléculaire et cellulaire, Université de Strasbourg, FRC1589, CNRS : UPR9002, Strasbourg, France

<p.gouet@ibcp.fr>, <francesca.fiorini@ibcp.fr>

Texte arrivé trop tard pour être inclus.