

## Interaction virus-cellule : Réplication

Vendredi 29 mars 2018 14h00-15h30

Modération : Isabelle Imbert, Evelyne Manet

Communications orales : O31 à O36

Affiches : P1 à P45

### O31

#### Le VIH-1 en haut débit : du transcriptome au translatome

Emmanuel Labaronne<sup>1</sup>, Didier Decimo<sup>2</sup>, Thibault Sohier<sup>1</sup>,  
Juliana Blin<sup>1</sup>, Théophile Ohlmann<sup>2</sup>, Emiliano Ricci<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de biologie et modélisation de la cellule, Université Claude-Bernard Lyon 1, École normale supérieure Lyon, CNRS UMR5239, Inserm U1210, Lyon 07, France

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

<emiliano.ricci@ens-lyon.fr>

Jusqu'à peu, il était établi qu'une cellule infectée par le virus d'immunodéficience humaine (VIH)-1 produisait une quarantaine de transcrits viraux à partir de l'ARN pré-messager. Cependant, des données plus récentes indiquent que ce chiffre serait largement sous-estimé et on dénombre à ce jour plus d'une centaine de transcrits alternatifs. Ces nouveaux transcrits diffèrent principalement par leur région non traduite en 5' (5'UTR). Une fois exportés dans le cytoplasme, ces ARNm viraux recrutent la machinerie traductionnelle de la cellule en compétition directe avec tous les transcrits cellulaires. Dans ce contexte, la 5'UTR des transcrits exerce une influence directe sur l'efficacité de traduction de la séquence codante en aval. L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les liens qui existent entre les différents isoformes des transcrits viraux et leur traduction grâce à des méthodes systématiques d'analyse à haut débit permettant d'analyser le transcriptome (RNAseq et séquençage Nanopore) ainsi que le translatome (Ribosome Profiling). Pour cela, nous disposons de deux modèles cellulaires d'infection (cellules Jurkat infectées par le virus pNL4.3, 80 % des cellules infectées) et de latence (cellules U937 dont l'expression du génome viral est induit par de la PMA et Ionomycine). À différents temps après l'infection ou l'induction, la fraction cytoplasmique a été récupérée pour la construction des banques de séquençage à haut débit (RNAseq, Ribosome Profiling et Nanopore). L'analyse du transcriptome révèle au moins 75 transcrits différents avec l'apparition de jonctions exon-exon non décrites auparavant. Les données du ribosome profiling nous ont permis de retrouver les différents sites d'initiation de la traduction de toutes les séquences codantes connues. Un site d'initiation est visible en aval de l'AUG canonique de Gag dans un cadre de lecture différent. Ce résultat suggère que le codon initiateur canonique de Gag n'est pas toujours reconnue lors du scanning par les petites sous unités ribosomales (*leaky scanning*). Au contraire, le site d'entrée interne du ribosome (IRES), précédemment décrit dans la région codante de Gag et conduisant à l'expression d'une protéine isoforme tronquée de Gag de 40 kDa, ne semble pas être actif en conditions d'infection. Étonnamment, l'analyse du translatome viral révèle également la présence d'une forte densité ribosomique dans la partie LTR en 5', supposée non codante. L'analyse approfondie de ce signal suggère la traduction de 11 micro-peptides de 4 à 43 acides aminés. Bien que ce signal puisse correspondre à d'autres protéines liant l'ARN, cette hypothèse est supportée par une analyse de la taille des empreintes ribosomales, correspondant à celle de ribosomes en élongation. Les sites d'initiation de la traduction de ces peptides correspondent à des codons initiateurs alternatifs (CUG, AUA, GUG, UUG). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la région LTR est activement traduite résultant en la synthèse de

micro-peptides qui pourraient avoir un rôle direct ou indirect sur le cycle viral.

### O32

#### La chromatinisation du génome du virus Herpès Simplex 1 latent est dépendante d'un triptyque corps PML/chaperons d'histone/histone H3.3

Camille Cohen, Armelle Corpet, Simon Roubille, Mohamed-Ali Maroui, Nolwenn Poccardi, Antoine Rousseau, Constance Kleijwegt, Olivier Binda, Pascale Texier, Nancy Sawtell, Marc Labetoulle, Patrick Lomonte

Institut NeuroMyoGène (INMG), Université Claude-Bernard Lyon 1, Inserm U1217, CNRS UMR5310, Lyon, France

<patrick.lomonte@univ-lyon1.fr>

L'établissement de latence du virus de l'Herpès simplex 1 (HSV-1) est contrôlé par les corps nucléaires PML (*promyelocytic leukemia nuclear bodies*, PML NBs) mais leur implication exacte reste encore une énigme. Les PML NBs sont connus pour leur activité antivirale aussi bien contre les virus à ADN qu'à ARN. Une des caractéristiques majeures de la latence du virus HSV-1 est l'interaction entre le génome viral et les PML NBs formant des structures nommées viral DNA-containing PML-NBs (vDCP-NBs), et associées à la répression transcriptionnelle du virus. L'utilisation d'un modèle d'infection de fibroblastes primaires humains, qui reproduit la formation des vDCP-NBs, combinée à une approche par immuno-FISH, a permis de montrer que les vDCP-NBs contiennent l'histone H3.3 et ses chaperons, les complexes DAXX/ATRAX et HIRA. La protéine HIRA est également observée au sein des vDCP-NBs dans les neurones des ganglions trijumeaux de souris infectées par HSV-1 ce qui suggère un rôle important de cette protéine et de ses partenaires dans le processus de latence *in vivo*. Des expériences de ChIP et de Re-ChIP nous ont permis de déterminer que le génome viral latent est spécifiquement chromatinisé avec l'histone H3.3 modifiée sur la lysine 9 par triméthylation (H3.3K9me3), ce qui est un signe de répression génique. L'inactivation individuelle des protéines des complexes chaperons de H3.3 affecte légèrement l'incorporation de H3.3 dans les génomes viraux latents, par contre, la co-inactivation d'une protéine de chaque complexe semble avoir un effet dramatique sur l'incorporation de H3.3. Ce résultat suggère qu'il existe une redondance d'activité entre les deux complexes chaperons de H3.3 pour la chromatinisation du génome viral latent. L'absence de PML (par traitement avec un shRNA ou par l'utilisation de cellules MEFs issues de souris PML KO) diminue significativement la chromatinisation H3.3 du génome HSV-1 latent sans remplacement par H3.1. Finalement, la déstabilisation des vDCP NBs par la protéine virale ICP0, essentielle *in vivo* pour la réactivation de HSV-1, permet la reprise de l'activité transcriptionnelle du virus et sa sortie de la latence. Cette étude démontre une régulation épigénétique du génome HSV-1 latent par une chromatinisation dépendante de H3.3 impliquant les complexes chaperons DAXX/ATRAX et HIRA. De plus, cette étude démontre un rôle majeur des PML NBs dans la chromatinisation H3.3 des génomes HSV-1 latents, et de manière plus générale l'implication directe des PML NBs dans le processus de chromatinisation d'un locus génique.

### O33

#### Hbc Nuclear Interactome Reveals Multiple Roles of RNA-binding Proteins in Viral Replication and Provides insights for the Development of Novel Host-Targeting Agents

Héloïse Auclair<sup>1</sup>, Hélène Chabrolles<sup>1</sup>, Serena Vegna<sup>1</sup>, Thomas Lahlali<sup>1</sup>, Brieux Chardès<sup>2</sup>, Yohann Coute<sup>2</sup>, Lucid Belmudes<sup>2</sup>, Yujin Kim<sup>1</sup>, Lee D Arnold<sup>3</sup>, David Grierson<sup>4</sup>, Benoît Chabot<sup>5</sup>, Christophe Combet<sup>1</sup>, Fabien Zoulim<sup>1</sup>, Julie Lucifora<sup>1</sup>, David Durantel<sup>1</sup>, Anna Salvetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inserm, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR5286, Centre Léon-Bérard, Lyon, France

<sup>2</sup> Inserm U1038 Inserm/CEA/UGA, Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble (BIG), Grenoble, France

<sup>3</sup> Discover Elucidations, LLC, Bloomington, États-Unis

<sup>4</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

<sup>5</sup> Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

<heloise.auclair@inserm.fr>

Converging evidences suggest that the Hepatitis B virus core protein (HBc), beside its well-known structural role to form nucleocapsids in the cytoplasm, could have important regulatory functions in the nucleus of infected hepatocytes, including the control of viral and/or cellular gene expression. To elucidate these functions, we performed a proteomic analysis of the cellular factors interacting with nuclear HBc in human hepatocytes. This interactome revealed a majority of highly interconnected RNA-binding proteins (RBPs), which participate in several steps of mRNA metabolism, including transcription, splicing and nuclear egress. We focused on two major HBc-interacting factors, SRSF10 and RBMX that were previously involved in cell differentiation and DNA repair. Functional analyses performed by a siRNA approach indicated that RBMX and SRSF10 were able to differentially regulate the levels of all viral RNAs most likely by acting at different steps of the viral life-cycle. Similarly, a small compound, affecting the activity of selected RBPs, severely impaired HBV replication by strongly reducing viral RNA accumulation. Altogether, these results strongly suggest that HBc interacts with some selected RBPs to control the fate of viral and/or cellular RNAs and provide new critical information for the development of novel host-targeting antiviral agents (HTA).

### O34

#### Coordination de la décapsidation et de l'import nucléaire du VIH-1 par la Transportin-1/TNPO1

Juliette Fernandez<sup>1</sup>, Anthony Machado<sup>2</sup>, Kathleen Gärtner<sup>2</sup>, Thibaut Léger<sup>3</sup>, Céilia Chamontin<sup>1</sup>, Camille Garcia<sup>3</sup>, Débora Portilho<sup>2</sup>, Laurent Chaloin<sup>4</sup>, Yohei Yamauchi<sup>5</sup>, Mickaël Blaise<sup>6</sup>, Sébastien Nisole<sup>1</sup>, Nathalie Arhel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viral Trafficking Restriction and Innate Signaling, Institut de recherche en infectiologie de Montpellier, CNRS, Université de Montpellier, France

<sup>2</sup> U941 Hôpital Saint-Louis, Paris, France, Inserm, Université Paris Diderot, France

<sup>3</sup> Plateforme protéomique structurale et fonctionnelle, Institut Jacques-Monod, CNRS, Université Paris-Diderot, France

<sup>4</sup> Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance, Institut de recherche en infectiologie de Montpellier, CNRS, Université de Montpellier, France

<sup>5</sup> Viral Cell Biology lab, Medical School, University of Bristol, Royaume-Uni

<sup>6</sup> Mycobacterial Pathogenesis and Novel Therapeutic Targets, Institut de recherche en infectiologie de Montpellier, CNRS, Université de Montpellier, France

<nathalie.arhel@irim.cnrs.fr>

<anthony.machado@inserm.fr>

Pour se répliquer, le VIH-1 est entièrement dépendant de sa capacité à atteindre le noyau afin d'intégrer son génome rétro-transcrit dans l'ADN cellulaire et se répliquer. Cet import nucléaire du génome viral se fait par un mécanisme actif par le pore nucléaire, ce qui permet au VIH d'infecter des cellules qui ne se divisent pas ou peu. Bien qu'il soit bien établi que le complexe de pré-intégration du VIH (PIC) comporte des éléments karyophiles lui permettant d'être reconnu par la machinerie de transport nucléocytoplasmique de la cellule, aucun mécanisme n'a encore été élucidé. En particulier, aucune protéine virale ni aucun transporteur cellulaire n'ont été identifiés comme nécessaire et suffisant au transport du PIC par le pore nucléaire. Des articles récents ont cependant donné un nouvel élan au domaine en proposant que la décapsidation virale, qui a lieu dans le cytoplasme, est intimement liée à l'import nucléaire du

génom. Par conséquent, il est probable que le médiateur cellulaire du passage par le pore nucléaire soit une protéine ou un complexe qui puisse interagir à la fois avec la machinerie du pore nucléaire et la capsid virale. Nos travaux identifient la  $\beta$ -karyophérine Transportin-1 / TRN-1 comme co-facteur de l'infection par le VIH-1 dans des lignées cellulaires et cellules T CD4 + primaires. La réduction de TRN-1 entraîne une diminution de la détection de l'ADN viral dans le compartiment nucléaire et provoque l'accumulation de capsides dans le cytoplasme, suggérant un défaut de décapsidation. Des expériences de co-immunoprécipitation suggèrent que TRN-1 peut interagir avec la capsid en cellules infectées. D'autres expériences de décapsidation nous ont permis de démontrer que TRN-1 provoque la décapsidation dans les cellules infectées et *in vitro*. Des alignements de séquences identifient un motif hPY-NLS dans la boucle d'interaction avec CypA de la capsid, avec un motif GP central. De la même manière, l'interaction de TRN-1 avec les cores du VIH déplacerait CypA, démontrant que TRN-1 et CypA sont en compétition avec le même site d'interaction sur la capsid. Notre étude suggère donc que TRN-1 est responsable de la décapsidation du PIC ce qui faciliterait l'import nucléaire du génome viral.

### O35

#### La biogenèse des gouttelettes lipidiques module la réplication du virus de l'hépatite C

Gabrielle Vieyres<sup>1</sup>, Florian Vondran<sup>2</sup>, Thomas Pietschmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Twincore - Center for Experimental and Clinical Infection Research, Allemagne

<sup>2</sup> ReMediES, Department of General, Visceral and Transplant Surgery, Hannover Medical School, Allemagne

<gabrielle.vieyres@twincore.de>

Les virus à ARN positif réarrangent les membranes intracellulaires de la cellule hôte pour former leur organelle de réplication. Dans le cas du virus de l'hépatite C (HCV), le réticulum endoplasmique (RE) est remodelé en un réseau membranaire (« membranous web »), qui concentre et protège les complexes viraux de réplication. La composition lipidique de l'hôte est cruciale pour cette réorganisation massive et les virus ont développé de multiples moyens pour la moduler. Les gouttelettes lipidiques sont l'organelle principale de stockage des lipides dans la cellule et sont essentielles à la morphogénèse de l'HCV. Elles sont issues de la synthèse de triglycérides par les diacylglycérol acyltransférases DGAT1 et 2 entre les deux monocouches de la membrane du RE. Nous avons observé qu'une surexpression modérée de DGAT2 diminuait de 10 à 20 fois la réplication du génome complet ou partiel de l'HCV dans des cellules d'hépatome, sans altérer celle du coronavirus humain HCoV 229E, un autre virus à ARN positif. Ce phénotype corrèle avec l'activité enzymatique de DGAT2 et avec l'abondance des gouttelettes lipidiques. En effet, des mutants de DGAT2 catalytiquement inactifs n'inhibent pas la réplication de l'HCV et l'effet antiviral de DGAT2 est compensé par des inhibiteurs spécifiques de DGAT2 (mais pas de DGAT1). Il est aussi accompagné d'une diminution d'environ 4 fois du nombre de foci de la protéine virale NS5A, un marqueur des usines de réplifications, comparé aux cellules infectées contrôles. Ces résultats suggèrent que l'activité excessive de DGAT2 et la synthèse exagérée de gouttelettes lipidiques pourraient appauvrir localement les stocks d'acides gras et/ou de diacylglycérol dans la membrane du ER. Ce déséquilibre pourrait affecter la néosynthèse de membranes ou leurs propriétés physiques, et en conséquence empêcher la formation du réseau membranaire lors de l'infection par l'HCV. Étant donné le rôle de DGAT1 pour initier l'assemblage de l'HCV, nos résultats laissent soupçonner que le HCV s'est adapté pour utiliser la voie des triglycérides dépendant de DGAT1, qui est bénéfique pour son assemblage et non délétère pour sa réplication, plutôt que de DGAT2. Nous étudions en ce moment la formation du réseau membranaire dans les cellules exprimant un excès de DGAT2 et nous réalisons des tests de complémentation avec des lipides pour affiner le mécanisme de contrôle de la réplication de l'HCV par DGAT2.

## O36

**Étude du rôle de la glycoprotéine de membrane durant le cycle infectieux du WNV**

Justine Basset<sup>1</sup>, Maxence Feher<sup>1</sup>, Julien Burlaud-Gaillard<sup>2</sup>,  
Philippe Roingeard<sup>2</sup>, Felix Rey<sup>3</sup>, Nathalie Pardigon<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Environnement et risques infectieux (ERI), Institut Pasteur, Département infection et épidémiologie, Paris, France

<sup>2</sup> Laboratoire de microscopie électronique, Inserm U966, Faculté de médecine, Tours, France

<sup>3</sup> Structural Virology Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France

<justine.basset@pasteur.fr>

<nathalie.pardigon@pasteur.fr>

Le virus West Nile (WNV) est un arbovirus (*arthropod-borne virus*) neurotrope, membre de la famille des *Flaviviridae* et du genre *Flavivirus*. Le WNV est actuellement l'un des arbovirus le plus répandu dans le monde et sa forte capacité de (ré)émergence pose un problème de santé publique important. Le(s) rôle(s) de la protéine hydrophobe de membrane (M) de ce virus est/sont encore peu caractérisé(s). Cette glycoprotéine est ancrée dans la membrane virale et joue un rôle structural important dans les processus de fusion et de maturation des particules virales. Cependant, cette protéine interagit avec des facteurs cellulaires des hôtes mammifères et des vecteurs moustiques, suggérant qu'elle joue également un rôle non structural dans le cycle infectieux des *Flavivirus*. La substitution de deux résidus de la protéine M (identifiés comme interagissant entre eux par analyse structurale) par mutagenèse dirigée a permis d'obtenir les virus WNV mutants M1, M2 et M1+2. Nous avons caractérisé le cycle infectieux de ces mutants afin d'identifier d'autres rôles

potentiels de la protéine du WNV lors de l'infection virale. La stabilité des mutations a été testée *in vitro*. Alors que chez le virus M1 la mutation « réverte » dès 48 h post-infection, la mutation du virus M2 est stable et son introduction permet de stabiliser la première mutation M1 jusqu'à 10 passages. Nous avons aussi montré que la mutation M1 seule contribue à une diminution importante de la production et de la dissémination des particules virales alors que la mutation M2 n'est pas délétère pour le cycle infectieux. De plus, l'introduction des mutations M1 et M2 ensemble restaure partiellement un phénotype de virus sauvage. Comme les étapes précoces du cycle viral des virus mutants (entrée, fusion, décapitation, traduction et réplication) ne semblaient pas affectées, nous nous sommes intéressés aux étapes plus tardives. Par microscopie électronique à transmission, nous avons mis en évidence que la mutation M1 affecte la sécrétion des virions qui s'accumulent dans le réticulum endoplasmique (RE). De plus, l'assemblage des particules virales est également altéré, les virions présentant une morphologie atypique. Enfin, nous avons pu montrer que l'introduction de la mutation M1 n'entraîne plus la mort cellulaire induite par l'infection virale. De plus, les mutants M1 ou M1+2 ne semblent plus capables d'induire les voies de réponse au stress du RE (UPR, « *unfolded protein response* ») conduisant à une inhibition de la synthèse protéique dès 60 h post-infection. Il est donc possible que cette inhibition limite la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène et soit ainsi à l'origine de la survie cellulaire observée. Enfin, nous avons également entrepris l'étude de la pathogenèse associée aux virus mutants *in vivo* dans un modèle murin. Ce travail montre pour la première fois que la protéine M du WNV joue un rôle important dans la sécrétion des virions. De plus, la protéine M semble également être impliquée dans l'induction de la réponse UPR et indirectement dans la mort cellulaire, rôle jusqu'à présent inédit.