

Structure et morphogénèse virale

Vendredi 23 mars 2018, 14 h 00-15 h 15

Modérateurs : Aurélie Albertini & Thibault Crépin

Communications orales O39 à O44

Affiches P70 à P80, P93, P94

O39

Nucléoprotéines du virus de la grippe : importance de la queue (Ntail)

Amélie Donchet¹, Justine Oliva², Alice Labaronne¹, Sigrid Milles¹, Malene Jensen¹, Martin Blackledge¹, Jean-Marie Bourhis¹, Rob Ruigrok¹, Mariette Ducatez², Thibault Crépin¹

¹ Institut de biologie structurale (IBS), Université Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, Grenoble, France, France

² École nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT), IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

<adonchet@ibs.fr>

Les virus grippaux infectent les hommes, les mammifères et les oiseaux et constituent un problème majeur de santé, à la fois humaine et animale. Quatre types de virus grippaux ont été identifiés : les virus de type A, B et C, ainsi que le virus de type D, récemment découvert [1, 2]. Ils possèdent tous un génome à ARN segmenté et présentent la particularité de se répliquer dans le noyau de la cellule infectée. Les ribonucléoprotéines (RNPs), constituées d'un segment d'ARN viral encapsidé par la nucléoprotéine (NP) et sur lequel est fixée une ARN polymérase, sont les entités fonctionnelles du virus. NP est l'un des déterminants du tropisme viral et serait, en plus de son rôle structural dans la RNP, l'élément clé de la transition entre transcription et réplication. Notre équipe travaille depuis de nombreuses années à détailler les bases moléculaires associées au fonctionnement de l'ensemble de la machinerie répliquative des virus grippaux [3-7]. Après avoir montré l'importance de la forme monomérique de NP dans la formation des RNPs dans le cas du virus grippal de type A [5], nous avons cherché à détailler les spécificités associées à NP de type B (B/NP) et mis en évidence des différences dans le mode de liaison de l'ARN entre les protéines de type A (A/NP) et de type B [7]. Nous avons alors décidé d'étendre nos travaux aux NP de type C (C/NP) et de type D (D/NP). L'obtention de la structure cristallographique de D/NP qui sera présentée au cours de cette intervention et sa comparaison avec celles de A/NP et B/NP permet maintenant de définir un corps commun aux NPs des *Orthomyxoviridae* à partir duquel chacune aurait évolué en développant des spécificités. Les comparaisons de séquences montrent ainsi qu'A/NP et B/NP possèdent une extension N-terminale dont la séquence est type-dépendant. C/NP et D/NP possèdent quant à elles chacune une extension C-terminale propre. Nous avons caractérisé structurellement et fonctionnellement ces extensions N-et C-terminales [8]. Ces travaux seront présentés ici.

1. Hause et al. *PLoS Pathog* 2013.
2. Sheng et al. *Arch Virol* 2014.
3. Dias et al. *Nature* 2009.
4. Crépin et al. *J Virol* 2010.
5. Chenavas et al. *PLoS Pathog* 2013.
6. Reich et al. *Nature* 2014.
7. Labaronne et al. *Viruses* 2016.
8. Labaronne et al. *Sci Rep* 2017.

O40

Chemins cinétiques d'assemblage de capsides virales icosaédriques empaquetant du génome à ARN

Maelenn Chevreuil¹, Jingzhi Chen¹, Stéphane Bressanelli², Sophie Combet³, Doru Constantin¹, Jérol Degrouard¹, Johannes Möller⁴, Guillaume Tresset¹

¹ Laboratoire de physique des solides (LPS), CNRS UMR8502, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay cedex, France

² Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), CNRS UMR9198, CEA, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

³ Laboratoire Léon Brillouin (LLB), CNRS UMR12, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), Saclay, Université Paris-Saclay, France

⁴ European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), 6 rue Jules Horowitz BP220 38043 Grenoble cedex, France

<guillaume.tresset@u-psud.fr>

L'empaquetage du génome est une étape cruciale pour la survie des virus, et elle se doit d'être accomplie de manière rapide et précise. De façon surprenante, les chemins cinétiques qui conduisent aux virions infectieux à partir de leurs composants purifiés sont mal connus. Des simulations numériques gros grains ont permis d'identifier des chemins cinétiques de types coopératif et nucléation-croissance, mais même pour les virus les plus simples, aucune expérience ne fournit à ce jour une description claire de ces phénomènes. Nous avons ainsi sondé la dynamique d'auto-assemblage de capsides virales icosaédriques empaquetant du génome à ARN, en utilisant la diffusion des rayons X aux petits angles résolue en temps avec une source synchrotron. Pour ce faire, nous avons utilisé le virus de marbrure chlorotique de la cornille (*cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV, en anglais), un virus de plante à ARN simple brin, dont la capsid (28 nm de diamètre) peut s'auto-assembler et se désassembler en sous-unités dimériques via des espèces intermédiaires à longue durée de vie [1,2]. En ajustant les interactions entre sous-unités et génome à travers la force ionique, nous avons observé que des complexes nucléoprotéiques amorphes d'environ 30 nm en taille étaient formés par un chemin cinétique coopératif. Ces complexes à leur tour relaxent en virions via un chemin cinétique de type nucléation-croissance en renforçant les interactions entre sous-unités par le pH. L'association des sous-unités avec le génome se produit en 30 ms alors que la relaxation structurale des complexes en virions peut se dérouler sur plusieurs heures. L'énergie de liaison des sous-unités avec le génome est modérée (~4 kcal/mol) alors que la barrière énergétique séparant les complexes nucléoprotéiques des virions est particulièrement haute (~12 kcal/mol). Les espèces à l'équilibre ont été imagées par cryomicroscopie électronique à transmission et corroborent les données obtenues par diffusion des rayons X. Nous proposons enfin un paysage d'énergie libre schématisé qui résume les chemins cinétiques observés et qui souligne le rôle pivot des complexes nucléoprotéiques dans l'assemblage des virions.

Law-Hine D, et al., *J Phys Chem Lett* 2015 ; 6 : 3471-6. Law-Hine D, et al., *Soft Matter* 2016 ; 12 : 6728-36.

O41

Structure et fonction de l'endonucléase responsable du vol de la coiffe du virus Toscana

Sana Lessoued¹, Maria Mate¹, Gabriel Bragagnolo¹, Juan Reguera²

¹ Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB), INRA UMR7257, Aix-Marseille Université UMR7257, CNRS UMR7257, Faculté des Sciences de Luminy, Case 932, 163, avenue de Luminy 13288 Marseille cedex 09, France

² Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB), INRA UMR7257, Aix-Marseille Université UMR7257, Inserm, Faculté des Sciences de Luminy, Case 932, 163, avenue de Luminy 13288 Marseille cedex 09, France

<reguera@afmb.univ-mrs.fr>

Les virus possédant un génome ARN de polarité négative segmenté initient sa transcription par un mécanisme de « vol de la coiffe » (*cap-snatching*). Pour cela, ces virus codent dans la polymérase virale, une endonucléase qui va ainsi voler l'extrémité 5' coiffée des ARN messagers cellulaires. Cette amorce d'origine cellulaire est alors utilisée pour initier la transcription

des différents ARN viraux. Récemment, les structures 3D d'endonucléases de plusieurs virus hautement pathogènes pour l'homme ont été décrites (Reguera J. *et al.* 2016; Fernandez Y. *et al.* 2016) Ces données permettent d'enrichir nos connaissances sur les mécanismes de transcription de ce grand groupe d'agents pathogènes infectant les hommes, les animaux et les plantes. Ici, nous présentons la caractérisation structurale et fonctionnelle de l'endonucléase du virus Toscana, la première signalée pour un phlebovirus, une famille importante d'arbovirus hautement pathogène tels que le virus de la fièvre de la Vallée du Rift. La structure révèle de nouvelles caractéristiques inattendues qui diffèrent des endonucléases d'autres virus apparentés tels que Influenza, Hantaan ou La Crosse, mais tout en maintenant l'activité endonucléase. Nos données confirment que l'activité endonucléase *in vitro* de ces enzymes dépend de la présence d'une histidine catalytique dans le site actif, et valide la classification proposée de ces enzymes en His+ et His-. En outre, la structure de l'endonucléase du virus Toscana suggère des différences intéressantes par rapport au mécanisme du vol de la coiffe proposé pour le virus de la grippe. Ce travail ouvre la voie vers la découverte de nouveaux antiviraux à large spectre ciblant la transcription virale.

O42

The crystal structure of TYMV PRO/DUB complexed to ubiquitin reveals how the enzyme distinguishes its substrates

Sonia Fieulaine¹, Martin Witte², Christopher Theile², Maya Ayach¹, Hidde Ploegh², Isabelle Jupin³, Stéphane Bressanelli¹

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

² Whitehead Institute for Biomedical Research, 9 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, USA.

³ Institut Jacques Monod (IJM), Université Paris Diderot-Paris 7, CNRS UMR7592, France

<stephane.bressanelli@i2bc.paris-saclay.fr>

Ubiquitylation and deubiquitylation events are often involved during viral infection. In some cases, the host can tag viral proteins with ubiquitin, likely to target them towards proteasome for degradation, and the virus is able to remove or edit these resulting poly-ubiquitin chains. Deubiquitylation of tagged viral proteins is done by deubiquitinases (DUB), which are either host enzymes recruited by the virus or virally encoded enzymes. Interestingly, DUBs encoded by some single-strand, positive-sense RNA viruses are actually bifunctional enzymes also responsible for the viral polyprotein maturation through a protease activity (PRO). In this case, both PRO and DUB activities rely on a single catalytic site, able to cleave a peptide or an isopeptide bond respectively, and the molecular determinants allowing the enzyme to switch from a substrate to another and from an activity to another remain largely unknown. In order to address the key question of how a viral PRO/DUB can discriminate substrates and act as a PRO or a DUB, we study *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), whose replication cycle appears to involve reversible ubiquitylation events. TYMV PRO/DUB is indeed a PRO involved in proteolytic processing of the viral replication precursor, and also a DUB that is able to rescue the ubiquitylated viral polymerase from degradation. The polyprotein cleavage sites are well described but the type of poly-ubiquitin chain(s) that are attached to the viral polymerase is not yet known. We thus have started a project to document how TYMV PRO/DUB recognizes the polyprotein or the ubiquitylated polymerase, and to understand the regulatory elements that control the dual PRO/DUB activities. We have solved the crystal structure of TYMV PRO/DUB in complex with one module of ubiquitin. The protein-protein interface is unusual in its composition (especially as compared to known ubiquitin-DUB interfaces) and mobility (as confirmed by molecular dynamics simulations) and distributed in two parts. On the DUB side, it involves both the core OTU DUB fold and the *Tymoviridae*-specific N-terminal lobe. This allows contact simultaneously with the two major recognition patches on the ubiquitin side. A subsequent mutagenesis study coupled to an *in vitro* DUB assay has then been undertaken to validate this

interacting surface. The comparison of this PRO/DUB-Ub structure to that of a PRO-PRO complex that occurs during polyprotein processing allowed us to identify key residues specific to each partner, which gave us clues to understand how the bifunctional enzyme can distinguish two of its substrates. Finally, we could model the positioning of di-Ubi molecules on TYMV PRO/DUB and identify those that are likely to occur and those that are impossible due to steric clashes. These models will help us to decipher how the viral polymerase is ubiquitylated by the host and how the virus itself can save its polymerase by degrading the poly-ubiquitin chains.

Jupin *et al.* *PLoS Pathog* 2017 ; 13 : e1006714. Lombardi, *et al.* *PLoS Pathog* 2013 ; 9 : e1003560. Chenon *et al.* *EMBO J* 2012 ; 31 : 741-53.

O43

Decoding morphogenesis of Ichnovirus by RNA interference

Ange Lorenzi, Anne-Nathalie Volkoff

Diversité, génomes interactions microorganismes-Insectes [Montpellier] (DGIMI), INRA UMRI1333, Université Montpellier 2 sciences et techniques, Université de Montpellier, place Eugène Bataillon 34095 Montpellier cedex 5, France

<anne-nathalie.volkoff@inra.fr>

Polydnoviruses (PDVs) are a group of mutualist DNA viruses associated to several endoparasitic wasps. They are integrated in the wasp genome and they are produced in a specialized region of the ovaries called calyx. PDVs are injected during wasp oviposition in lepidopteran hosts, causing immune and developmental dysfunctions that permit the wasp larva to develop. PDVs are classified into two taxa Bracoviruses (BVs) and Ichnoviruses (IVs) associated to Braconidae and Ichneumonidae wasps respectively. BVs originates from the integration of a nudivirus in the genome of a wasp ancestor whereas IVs originates from the integration of a virus yet uncharacterized. The function of several genes involved in the formation of BV virions have been characterized, thanks to their sequence homology with core genes shared between Nudiviruses and Baculovirus. Recently, 54 genes that may be involved in IV morphogenesis were identified in three clusters in the wasp *Hyposoter didymator* genome. To date, IVs are related to no virus taxa, so we are unable to predict functions associated with these genes. In this work, we tried to determine if some of these genes were actually involved in IVs morphogenesis, using RNA interference technique. Our results show the feasibility of this experimental approach and confirm the involvement of some of these genes in IV morphogenesis.

O44

Cycle viral de l'hépatite E et identification de 3 formes de la protéine de capsid ORF2

Claire Montpellier, Czeslaw Wychowski, Ibrahim M. Sayed,

Jean-Christophe Meunier, Jean-Michel Saliou, Maliki Ankavay,

Anne Bull, André Pillez, Florence Abravanel, François Helle,

Etienne Brochot, Hervé Drobecq, Rayan Farhat, Cécile-Marie Aliouat,

Juliano Haddad, Jacques Izopet, Philip Meuleman, Anne Goffard,

Jean Dubuisson, Laurence Cocquerel

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

<claire.montpellier@ibl.cnrs.fr>

L'infection par le virus de l'hépatite E (HEV) est la cause majeure d'hépatites aiguës dans le monde. Environ 2 milliards de personnes vivent dans des régions endémiques pour le HEV et risquent de contracter une infection. Vingt millions de personnes seraient infectées chaque année dans le monde et on estime à 70 000 le nombre de décès par an lié à cette infection. En France, la séroprévalence est de 22 %. Le HEV est un petit virus quasi-enveloppé d'environ 30 nm de diamètre et est transmis principalement par voie féco-orale. Son génome, constitué d'une molécule

d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 7200 nt, code 3 protéines dont la protéine de capsid ORF2. Jusqu'ici, peu de données étaient disponibles sur les mécanismes du cycle infectieux du HEV. La raison principale a résidé dans la difficulté d'amplifier efficacement ce virus en culture cellulaire. Nous avons utilisé des particules du HEV produites en culture cellulaire (HEVcc de génotype 3) ainsi que des sera et des selles de patients infectés par le HEV. Les préparations virales ont été fractionnées sur gradient ou coussin d'iodixanol. Des tests d'infectivité ont été réalisés *in vitro* et sur des souris au foie humanisé. Les protéines virales ont été analysées par des approches biochimiques et protéomiques. Les particules infectieuses ont été analysées en microscopie électronique à transmission. Les niveaux d'antigènes HEV ont été mesurés à l'aide du kit ELISA Wanta. Nous avons développé un système efficace de culture cellulaire du HEV dans lequel les protéines virales et les particules infectieuses étaient produites très précocement. Nous avons purifié les particules virales et montré qu'elles étaient hautement infectieuses *in vitro*, mais également *in vivo*. De façon intéressante et pour la première fois, nous avons déterminé l'ultrastructure des particules virales produites en culture cellulaire ou isolées de sera et de selles de patients et identifié la séquence précise de la protéine de capsid ORF2 associée aux particules infectieuses. De manière importante, nous avons démontré que lors de son cycle infectieux, le HEV produit de grandes quantités de protéine de capsid ORF2 mais seule une fraction de celle-ci est associée aux particules infectieuses. De plus, nos analyses révèlent que, en culture cellulaire mais également chez les patients infectés, le HEV produit 3 formes de la protéine de capsid ORF2 : ORF2i (infectieuse/intracellulaire), ORF2g (glycosylée) et ORF2c (clivée). 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 mais sont les antigènes majeurs présents dans le sérum des patients infectés par le HEV. Notre étude apporte des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes moléculaires du cycle viral et du diagnostic du HEV (Montpellier *et al.*, *Gastroenterology* 2017).

P70 Single-molecule monitoring of Hepatitis B Virus nucleocapsid assembly

Maelenn Chevreuil^{1,2}, Karen Perronet³, Michael Nassal⁴, Stéphane Bressanelli², Guillaume Tresset

¹ Laboratoire de physique des solides (LPS), CNRS UMR8502, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay 91405 Orsay cedex, France

² Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), CNRS UMR9198, bâtiment 21, avenue de la Terrasse 91190 Gif-sur-Yvette, France

³ Institut d'Optique Graduate School (IOGS), CNRS, 2 avenue Augustin Fresnel, 91127 Palaiseau cedex, France

⁴ University Hospital Freiburg, Freiburg, Allemagne
<stephane.bressanelli@i2bc.paris-saclay.fr>

Hepatitis B virus (HBV) is one of the most serious human pathogens, with nearly 900,000 deaths per year from serious liver diseases caused by chronic HBV infection. HBV is an enveloped virus with an icosahedral nucleocapsid made of a protein shell that encloses the RNA pregenome (pgRNA) prior to its reverse transcription into DNA. This RNA-loaded capsid can self-assemble *in vitro* from purified components, namely pgRNA and HBV core protein (Cp183) dimers. This is by itself a physically remarkable phenomenon, as there are currently no physical model accounting for the dynamic pathways along which the hundreds of molecular building blocks making up a nucleocapsid fit into the final structure with pinpoint accuracy, overcoming a situation that recalls Levinthal's paradox for protein folding. This is also a now validated target for antiviral intervention, as capsid assembly modulators are now in clinical evaluation against HBV infection. We have started probing pgRNA encapsidation *in vitro* at the single-molecule (or rather singlecapsid) level by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). Owing to the high sensitivity of this technique, the number of fluorescently-labeled dimers binding to single RNA molecules grafted on a surface can be determined as a

function of time. Depending on the time frame explored (first steps of the capsid assembly, global process...), we expect to estimate this number with an accuracy of a few dimers at most and with a time resolution of a few hundred milliseconds. We have produced Cp183 with eGFP inserted in Core's outer spike and furthermore found experimental conditions where dissociated dimers can be imaged by TIRFM. We have thus visualized them along with fluorescently-labeled RNA (for now, nonviral RNA). We are now working with *in vitro* transcribed pgRNA and will present these first single-molecule results.

P71 Caractérisation fonctionnelle des ARN polymérase ARN-dépendantes des flavivirus dengue et Zika

Barbara Selisko¹, Supanee Potisophon¹, Véronique Fattorini¹, Rym Agred¹, Stéphane Priet², Isabelle Varlet¹, François Ferron¹, Axelle Collet¹, Corinne Sallamand³, Françoise Debart³, Jean-Jacques Vasseur³, Etienne Decroly¹, Bruno Canard¹

¹ Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB), INRA UMR7257, Aix-Marseille Université UMR7257, CNRS, Faculté des Sciences de Luminy, Case 932, 163, avenue de Luminy 13288 Marseille cedex 09, France

² Émergence des pathologies virales (EPV), Institut de recherche pour le développement UMRD190, Aix-Marseille Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Inserm, [EHESP], Faculté de médecine 27 bd Jean Moulin 13385 Marseille cedex 5, France

³ Institut des biomolécules Max Mousseron [Pôle Chimie Balard] (IBMM), CNRS UMR5247, Université de Montpellier, École nationale supérieure de chimie de Montpellier, Faculté de Pharmacie, 15 av. Charles Flahault, BP 14 491, 34093 Montpellier cedex 5, France
<barbara.Selisko@univ-amu.fr>

La fonction de l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp en anglais) des flavivirus (genre *Flavivirus*, famille *Flaviviridae*, virus à ARN simple brin, sens positif) réside dans le domaine C-terminal de la protéine non-structurale NS5. Elle assure la réplication du génome viral, et est donc absolument essentielle pour la réplication virale. Le domaine N-terminal contient des fonctions également essentielles impliquées dans la synthèse et la méthylation de la coiffe d'ARN génomique, qui agit directement après infection comme ARN messenger. La RdRp commence la synthèse d'ARN *de novo*, c'est-à-dire qu'elle produit son propre primer. Nous avons montré *in vitro* que 1) l'initiation *de novo* par le domaine RdRp recombinant du virus de la dengue sérotype 2 (DENV2) dépend d'une « boucle initiatrice » (*priming loop*) et, spécifiquement, d'un résidu histidine strictement conservé dans le genre *Flavivirus*; 2) le domaine RdRp de DENV2 a une préférence stricte pour commencer l'initiation avec un A, formant ainsi un site d'initiation spécifique; 3) après la synthèse de son primer pppAG (ou pppAGA) la RdRp rentre dans la phase processive d'élongation; 4) le domaine N-terminal de la protéine NS5 augmente l'efficacité des phases d'initiation et d'élongation du domaine RdRp de DENV2 et 5) les complexes d'élongation NS5/amorce-matrice de DENV2 et du virus Zika (ZIKV) incorporent très faiblement des analogues 2' O de nucléotides similaires au triphosphate du sofosbuvir, médicament antiviral actuellement utilisé contre le virus de l'hépatite C, du genre *Hepacivirus*, famille *Flaviviridae*.

P72 Étude structure/fonction de la méthyltransférase du virus Zika : perspectives pour le développement d'inhibiteurs à potentiel antiviral

Coralie Valle¹, Bruno Coutard¹, Karine Barral², Baptiste Martin¹, Mary Yates³, Julie Lichière¹, Barbara Selisko¹, Cécilia Eydoux¹, Wahiba Aouadi¹, Miguel Ortiz Lombardía⁴, Françoise Debart⁵, Jean-Jacques Vasseur⁵, Jean Claude Guillemot¹, Katherine Seley-Radtke³, Bruno Canard¹, Etienne Decroly¹

¹ Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB), INRA UMR7257, Aix-Marseille Université UMR7257, CNRS UMR7257, Faculté

des Sciences de Luminy, Case 932 163, avenue de Luminy 13288 Marseille cedex 09, France

² Centre de recherche en cancérologie de Marseille (CRCM), Aix-Marseille Université UM105, Institut Paoli-Calmettes UMR7258, Inserm U1068, CNRS UMR7258, 27 bd Leï Roure, BP 300059 13273 Marseille cedex 09, France

³ University of Maryland, Baltimore County, USA

⁴ Information génomique et structurale (IGS), Aix Marseille Université UMR7256, CNRS UPR2589, Parc scientifique de Luminy, 163 avenue de Luminy, Case 934 13288 Marseille cedex 09, France

⁵ Institut des biomolécules Max Mousseron [Pôle Chimie Balard] (IBMM), CNRS UMR5247, Université de Montpellier, École nationale supérieure de chimie de Montpellier, Faculté de Pharmacie, 15 av. Charles Flahault, BP 14 491, 34093 Montpellier cedex 5, France
<etienne.decroly@afmb.univ-mrs.fr>

Le virus Zika (ZIKV), un Flavivirus émergent transmis par les moustiques du genre *Aedes*, est à l'origine d'épidémies sans précédent notamment en Amérique du Sud. L'infection provoque un syndrome « grippal » et peut, dans certains cas, être responsable de complications neurologiques (syndrome de Guillain-Barré et microcéphalie chez le nouveau-né). La protéine NS5 du ZIKV est la protéine majeure de la réplication. Elle est composée de deux domaines : le domaine méthyltransférase (MTase) en N-terminal impliqué dans la synthèse de la coiffe et le domaine RNA dependent RNA polymerase (RdRp) en C-terminal impliqué dans la polymérisation de l'ARN viral. Nous avons étudié les propriétés structurales et fonctionnelles de la MTase du virus Zika. En utilisant des ARNs substrats synthétiques, nous avons montré que la MTase de ZIKV méthyle les structures coiffées sur la position N7 de la guanosine et la position 2'O du premier nucléotide des ARNs. Les méthylations des structures coiffées jouent un rôle clef pour la réplication virale car elles favorisent la traduction des ARNs viraux en protéines et empêchent leur détection par les senseurs de l'immunité innée tels que MDA5 et RIG-I. De plus, nous avons montré que la MTase de ZIKV catalyse des modifications épitranscriptomiques des ARNs viraux en méthylant spécifiquement en 2'O les adénosines internes aux séquences ARN. Bien que des modifications similaires aient été identifiées chez plusieurs virus, la fonction de ces modifications reste inconnue. La structure cristallographique de la MTase de ZIKV a également été résolue à 2 Å. Cette structure révèle d'importantes similarités avec le domaine MTase du virus de la dengue, avec un site de fixation de la coiffe, un sillon riche en acides aminés basiques impliqué dans le recrutement des ARNs et une poche accommodant le donneur de méthyle (S-adénosylméthionine ou SAM) à proximité de la tétrade catalytique. De plus, notre étude a mis en évidence l'existence de conformations alternatives au niveau de l'hélice αX à proximité immédiate du domaine de fixation du SAM. Ces conformations alternatives révèlent le rôle d'un motif Ser/Arg conservé de cette hélice dans le recrutement du SAM et le turnover enzymatique. L'ensemble de cette étude démontre que la MTase du ZIKV partage l'essentiel de ses propriétés structurales et fonctionnelles avec la MTase du virus de la dengue. Cette observation suggère la possibilité d'identifier des inhibiteurs pan-flavivirus. Nous avons étayé cette hypothèse en comparant l'inhibition des MTases du virus de la dengue et du virus Zika par des analogues de SAM, des inhibiteurs spécifiques du virus de la MTase du virus de la dengue et des analogues nucléosidiques flexibles appelés « fleximères ». L'ensemble de ces résultats contribue donc à une meilleure compréhension de l'activité MTase de ZIKV, un acteur central dans la réplication virale et l'échappement à la réponse immunitaire innée de l'hôte, et pourra servir de base pour le développement de futures molécules antivirales.

P73

L'extrémité N-terminale de la viroporine p7 du VHC contrôle le niveau de sécrétion des différents types de particules virales, modulant ainsi l'inféctivité spécifique

Solène Denolly¹, Chloé Mialon², Thomas Bourlet³, Fouzia Amirache¹, François Penin⁴, Brett Lindenbach⁵, Bertrand Boson¹, 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, 21 avenue Tony Garnier 69365 Lyon cedex 07, France

² Centre international de recherche en infectiologie (CIRI), École normale supérieure (ENS) Lyon, Université Claude Bernard-Lyon I (UCBL), CNRS UMR5308, Inserm, 21 avenue Tony Garnier 69365 Lyon cedex 07, France

³ Groupe immunité des muqueuses et agents pathogènes (Gimap), Université Jean Monnet Saint-Étienne EA3064, France

⁴ Institut de biologie et de chimie des protéines (IBCP), CNRS UMR5086, BMSSI, IBCP, Université de Lyon, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon, France

⁵ Yale School of Medicine, 333 Cedar Street New Haven CT 06510, USA
<solene.denolly@ens-lyon.fr>

Les viroporines sont de petites protéines virales transmembranaires avec une activité de canal ionique permettant de moduler les propriétés des membranes intracellulaires. Le virus de l'hépatite C (VHC) code pour une viroporine, p7, qui agit pendant l'assemblage, l'enveloppement et la sécrétion de particules virales. p7 est produit par clivage de la polyprotéine du VHC mais existe également en tant que précurseur E2p7, dont les fonctions sont mal définies. Dans cette étude, nous avons exploré comment le clivage retardé entre la glycoprotéine E2 et p7 peut réguler leurs fonctions associées à l'assemblage du virion et/ou la perturbation des propriétés des membranes cellulaires. Plus précisément, nous avons démontré que p7 est capable de réguler la voie de sécrétion cellulaire, ce qui induit la rétention intracellulaire des glycoprotéines du VHC et favorise l'assemblage des particules de VHC. Notre étude a également identifié une nouvelle fonction d'assemblage située à l'extrémité N terminale de p7, qui est dévoilée par la régulation du clivage entre E2 et p7. En effet, en coordonnant la rencontre entre les protéines non structurales NS2 et NSSA du VHC, responsables respectivement de l'apport des glycoprotéines E1E2 et des nucléocapsides virales aux sites d'assemblage, nous avons trouvé que la partie N-terminale de p7 contrôle les niveaux de sécrétions des différents types de particules virales mais aussi l'enveloppement de particules infectieuses. Au total, nos résultats soulignent un contrôle post-traductionnel critique de l'assemblage et de la sécrétion de particules de VHC qui régit leur infectivité spécifique.

P74

Contrôle de la réplication du virus ourlien par des protéines intrinsèquement désordonnées

Stefaniia Ivashchenko, Sigrid Milles, Damien Maurin, Malene Ringkjøbing Jensen, Rob Ruigrok, Martin Blackledge
Institut de biologie structurale, CEA, CNRS UMR5075, Université Grenoble Alpes, 71 avenue des Martyrs 38044 Grenoble, France
<martin.blackledge@ibs.fr>

Les oreillons est une maladie très contagieuse causée par le virus ourlien qui, malgré un vaccin, provoque des épidémies incontrôlables. Il est donc important de comprendre le mécanisme moléculaire de son cycle de vie. Ce virus appartient à la famille des *Paramyxoviridae*. Son ARN non segmenté monocaténaire de polarité négative est protégé par la nucléoprotéine (N) en formant des structures filamenteuses nucléocapsides (NC). La N joue un rôle essentiel dans la synthèse du génome viral. En effet, cette protéine avec la polymérase et son cofacteur phosphoprotéine (P) constitue la machinerie de réplication-transcription virale. La N et la P sont composées des domaines structurés et d'autres domaines dites intrinsèquement désordonnés, qui ne possèdent pas de structure stable. Le domaine structuré de N (Ncore) interagit avec l'ARN et P, qui est un tétramère dont les deux extrémités interagissent avec N. Les fonctions de la région désordonnée de N (Ntail) et de la plupart des régions désordonnées de P, restent cependant inconnues. Malgré que la morphologie du virus ourlien soit conservée parmi les autres membres de la famille, il existe quelques différences frappantes, dont le fait que Ntail ne semble pas interagir avec le C-terminus

de P. Dans ce projet, nous dévoilons les mécanismes des interactions entre diverses régions de N et P et finalement, nous expliquons comment les domaines intrinsèquement désordonnés de N et P sont impliqués dans la régulation complexe de la réplication virale.

P75

Caractérisation structurelle et fonctionnelle de la méthyltransférase nsp1 de CHIKV

Rhian Jones, Astrid Champlain, Ana Sofia Ferreira Ramos, Bruno Coutard, Juan Reguera

Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB), CNRS UMR7257, Aix-Marseille Université UMR7257, Faculté des Sciences de Luminy, Case 932, 163, avenue de Luminy 13288 Marseille cedex 09, France

<reguera@afmb.univ-mrs.fr>

Le virus du chikungunya (CHIKV) est un arbovirus qui se transmet via le moustique tigre de genre *Aedes*, provoquant des fièvres arthralgiques chez les hôtes humains. Comme tous les alphavirus, CHIKV possède un génome ARN simple brin à polarité positive, se répliquant par un complexe de réplication composé de quatre protéines non-structurales : les nsp1 à 4. Le Nsp1 est une méthyltransférase qui transfère une coiffe 5' au génome CHIKV pendant sa réplication, une caractéristique requise pour la traduction de l'ARN et l'évasion immunitaire de l'hôte. Malgré la présence d'une hélice amphipathique dans le nsp1 du CHIKV, censée être associée à la membrane plasmique, nous avons exprimé et purifié la protéine à partir d'un système bactérien en tant que monomère soluble. Bien que les données structurelles préliminaires indiquent que la protéine est bien repliée, l'apoptéine entière n'a pas produit de cristaux, probablement en raison d'une flexibilité ou inhomogénéité dans l'échantillon. Suite à des essais de protéolyses limitées nous ayant permis d'identifier des domaines essentiels stables, nous avons conçu des nouvelles constructions pour le criblage cristallographique. Le criblage sera à nouveau réalisé avec l'apoptéine et avec des inhibiteurs stabilisateurs nous avons identifiées via des essais TSA (*thermal shift assay*). Actuellement, il n'existe aucun exemple d'une structure nsp1 alphavirale. Une telle structure cristallographique nous permettrait de mieux comprendre le parcours atypique de méthylation des alphavirus, tout en servant de modèle pour le développement de nouveaux antiviraux. Nous réalisons également des essais afin de caractériser les activités de méthylation et guanylation de nsp1, avec des EMSAS pour analyser l'interaction entre nsp1 et l'ARN. Surtout, l'activité de l'échantillon bactérien sera comparée avec un échantillon produit dans des cellules d'insectes ; un système d'expression plus proche du vecteur naturel des alphavirus, le moustique. Nous comparons aussi leur association avec la membrane plasmique, en utilisant les techniques d'ultracentrifugation et la microscopie fluorescente. Les résultats pourraient nous permettre de répondre à plusieurs questions fondamentales dans le domaine de la biologie des alphavirus ; à savoir notamment si la membrane plasmique est indispensable pour l'activité de nsp1. Mieux comprendre le processus de méthylation de nsp1 sera déterminant dans la compréhension du fonctionnement du complexe de réplication dans sa totalité.

P76

NS1 des virus Influenza A : approches structurales et fonctionnelles pour de nouvelles stratégies anti-virales

Alan Wacquiez¹, Franck Coste², Caroline Blondeau¹, Emmanuel Kut¹, Virginie Nadan², Stéphane Goffinon², Bertrand Castaing², Daniel Marc¹

¹ UMR1282-Infectiologie et Santé Publique, INRA Centre Val-de-Loire, 37380 Nouzilly, France

² CNRS, Centre de biophysique moléculaire, Orléans, France

<alan.wacquiez@inra.fr>

Les virus *Influenza A* sont responsables chez l'homme d'épidémies saisonnières et de pandémies, et d'épizooties chez les volailles. L'arsenal

thérapeutique se limite actuellement à deux inhibiteurs de la neuraminidase virale. Mais l'on peut craindre le développement de souches virales résistantes, et il est urgent de rechercher de nouvelles molécules antivirales. Les virus *Influenza* échappent aux défenses cellulaires grâce notamment à la protéine non-structurale NS1, par plusieurs mécanismes : inhibition du système de défense 2'-5' oligoadenylate synthetase/RNase L, inhibition du système d'activation par les RIG-like helicases et de l'activation de PKR, blocage de la maturation et de l'export nucléo-cytoplasmique des ARN messagers cellulaires. Des travaux antérieurs dans notre laboratoire ont montré que le RNA-binding domain (RBD) de NS1 se lie à des motifs de séquence d'ARN qui sont hautement conservés dans les ARN de polarité positive (ARNc et ARNm) qui sont produits au cours du cycle viral (Marc *et al.*, 2013). De plus, la double-substitution R38A-K41A dans le RBD, qui abolit l'interaction de ce dernier avec les ARN, réduit considérablement la réplication du virus et abolit sa pathogénicité. NS1 étant requise pour le déroulement normal du cycle viral, elle apparaît comme une cible prometteuse de nouveaux anti-viraux. L'objectif de ce travail est d'identifier les déterminants structuraux et fonctionnels de l'interaction NS1-ARN, par la détermination de la structure 3D de NS1 liée à des ligands ARN spécifiques, afin de permettre à plus long terme la recherche d'inhibiteurs ciblant spécifiquement cette interaction. Nous avons purifié et cristallisé plusieurs variants du RBD de NS1, représentatifs de la diversité des séquences de la protéine. Nous avons conçu plusieurs petits ARN dérivés des aptamères précédemment sélectionnés au laboratoire (Marc *et al.*, 2013), et nous étudions par retard sur gel leurs interactions *in vitro* avec les RBD purifiés. Après sélection des meilleurs ligands parmi ces petits ARN, nous optimiserons la formation de complexes et leur cristallisation, afin d'en déterminer la structure 3D. De plus, puisque nos résultats antérieurs suggèrent l'interaction de NS1 avec des motifs conservés des ARN de polarité positive du virus, nous chercherons à évaluer l'importance biologique de ces interactions dans le cycle viral, par la caractérisation phénotypique de virus mutants produits par génétique inverse, porteurs de mutations qui suppriment dans les ARNm viraux les motifs putatifs interagissant avec NS1.

P77

Étude de la dissociation thermique de la capsid virale

Jingzhi Chen¹, Maelenn Chevreuil¹, Sophie Combet², Naima Nhiri³, Eric Jacquet³, Yves Lansac⁴, Guillaume Tresset¹

¹ Laboratoire de physique des solides (LPS), CNRS UMR8502, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay cedex, France

² Laboratoire Léon Brillouin (LLB), CNRS UMR12, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) Saclay, Université Paris-Saclay, France

³ Institut de chimie des substances naturelles (ICSN), CNRS UPR2301, Avenue de la terrasse 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

⁴ University of Tours, Laboratory Greman, UMR 7347, CNRS, France <guillaume.tresset@u-psud.fr>

Le désassemblage des capsides, qui vise à libérer le génome en vue de son expression et de sa réplication, est une étape cruciale dans le cycle de vie des virus. Si la plupart des capsides, une fois purifiées, peuvent être, *in vitro*, facilement dissociées en sous-unités protéiques en ajustant le pH, la force ionique et la température, les mécanismes sous-jacents restent mal connus. Nous avons étudié la dynamique de désassemblage du virus de la marbrure chlorotique de la Cornille (*cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV, en anglais), un virus de plante à ARN simple brin dont la capsid mesure 28 nm de diamètre. Pour ce faire, nous avons utilisé d'une part, des techniques expérimentales telles que la diffusion de neutrons aux petits angles et la spectrofluorescence et, d'autre part, des techniques de modélisation pour décrire la dissociation d'une capsid virale dont les sous-unités interagissent à travers une attraction hydrophobe et une répulsion électrostatique, respectivement à courte et longue portée. À l'aide de ces différentes approches, nous avons conçu un modèle de réseau de champ moyen reliant la température de fusion de la capsid aux énergie attractive, charge effective et potentiel chimique des sous-unités. Grâce

aux mesures de fluorescence, réalisées en augmentant progressivement la température des capsides pleines et vides en solution, nous illustrons la manière dont le modèle donne accès aux paramètres d'interaction de ces capsides pour diverses conditions ioniques [1]. Grâce aux expériences de désassemblage de la capsid du CCMV, réalisées par diffusion de neutrons aux petits angles, nous avons observé une légère contraction des capsides virales. Celle-ci est sans doute due à l'augmentation de la température qui engendre un renforcement de l'interaction hydrophobe entre les sous-unités. En prenant en considération la dépendance en température de l'interaction hydrophobe dans un modèle de réseau homogène, nous avons pu donner une meilleure estimation de la charge effective. Grâce au modèle de réseau hétérogène où, deux ensembles de sites représentent les différentes sous-unités de la capsid (AB et CC) avec des forces d'interaction asymétriques, nous avons pu montrer que le désassemblage de la capsid passe d'une transition forte, en une étape, à une transition graduelle, en deux étapes [2]. Cette transition, consistante avec les observations réalisées par fluorescence, s'effectue lorsque l'on diminue l'interaction hydrophobe entre les sous-unités AB et CC du modèle hétérogène.

G. Tresset, *et al. Phys Rev Appl* 2017 ; 7 : 014005.

J. Chen *et al. J. Phys Condens. Matter* 2017 ; 29 : 474001.

P78

Caractérisation du complexe N0-P du virus respiratoire syncytial et homologie structurale entre Paramyxovirus

Camille Esneau¹, Pierre Roblin², Sébastien Brûlé³, Bertrand Raynal³, Olivier Sperandio⁴, Charles-Adrien Richard¹, Jenna Fix¹, Jean-François Elouët¹, Marie Galloux¹

¹ Unité de recherche virologie et immunologie moléculaires (VIM), INRA UR0892, Centre de recherche de Jouy-en-Josas 78352 Jouy-en-Josas cedex, France

² Synchrotron SOLEIL (SOLEIL), INRA (INRA), Gif-sur-Yvette, France

³ Plate-forme de biophysique moléculaire, Centre d'innovation et recherche technologique, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, Paris 75015, France

⁴ Laboratoire bioinformatique structurale, Département de biologie structurale et chimie, Institut Pasteur de Paris, 25-28 rue du Dr Roux, Paris 75015, France

<marie.galloux@inra.fr>

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est le principal agent responsable de maladies respiratoires sévères (bronchiolite, pneumonie) chez le nouveau-né et le veau. Le VRS appartient à l'ordre des Mononegavirales, virus enveloppés dont le génome est constitué d'un ARN non segmenté de polarité négative, encapsidé par la nucléoprotéine N. Au cours du cycle viral, l'apport de protéine N néo-synthétisée monomérique n'interagissant pas avec l'ARN, nommée N0, constitue un pré-requis à l'encapsidation du génome viral. Comme l'ensemble des virus de cet ordre, la protéine N est maintenue sous la forme N0 via son interaction avec la phosphoprotéine virale P qui joue le rôle de chaperon. Si de nombreuses structures de complexes N0-P sont actuellement disponibles, celle du VRS reste à établir. Les difficultés d'obtention de cristaux de ce complexe reposent sur la forte propension de la protéine N recombinante à oligomériser et à interagir avec l'ARN. Nous avons récemment identifié le domaine N-terminal (1-30) de P comme critique pour son activité de chaperon. Afin d'obtenir un complexe N0-P du VRS recombinant stable en vue de son étude structurale, des mutants de délétion de N ont été co-exprimés en bactérie *E. coli* en présence du fragment P1-40 (P40) fusionné à l'étiquette GST. Nos résultats montrent que la délétion des 30 résidus N-terminaux de N (NΔ30) est nécessaire et suffisante pour purifier une protéine N monomérique sans ARN, et révèle un rôle critique du bras C-terminal de la protéine N dans l'inhibition de l'interaction avec l'ARN. L'obtention d'un complexe NΔ30-P40 recombinant a permis l'obtention de données structurales en solution notamment par Small Angle X-ray Scattering (SAXS) et ultracentrifugation analytique. Afin de caractériser le rôle des résidus C-terminaux de N et d'identifier le domaine d'interaction de P40, l'impact

de mutations ciblées de N sur l'activité du complexe polymérase et son interaction avec P a été étudié par des approches couplées de biologie cellulaire et de biochimie. L'ensemble de nos données suggère une forte homologie structurale entre les complexes N0-P du VRS et du métapneumovirus (hMPV), pour lequel la structure cristallographique a récemment été établie. Ces résultats seront une première étape dans le développement de nouvelles stratégies antivirales.

P79

Une proposition de classification structurale des jelly-rolls et des capsides virales qui les contiennent

Gael Pawlak, Guillaume Lecointre, Vijay Reddy, John Johnson, Marc Bergdoll

IBMP (Institut de biologie moléculaire des plantes), CNRS UPR2357, 12 rue du Général Zimmer 67084 Strasbourg cedex, France.

<marc.bergdoll@ibmp-cnrs.unistra.fr>

Il est aujourd'hui clairement établi que les protéines sont construites de façon modulaire et que si le nombre total de modules disponibles est encore une question ouverte, le fait que ce nombre soit fini n'est plus en débat. Par ailleurs, il est connu que les structures des protéines sont mieux conservées que leurs séquences et une classification des domaines d'un point de vue structural présente des avantages sur une classification basée uniquement sur les séquences. Le repliement en jelly-roll est un domaine structural remarquable et il fait partie des premières structures supersecondaires reconnues comme telles même si ce fut sous différents noms : "swiss roll", "8 stranded antiparallel beta barrel", "viral beta barrel" ... Les jelly-rolls sont formés d'environ 150 acides aminés organisés en deux feuillets se faisant face, chacun constitué de 4 brins beta antiparallèles, les boucles joignant les différents brins présentant des degrés de complexité et d'organisation variables. Bien qu'il ne soit pas limité aux virus, ce motif structural constitue le composant majeur d'un grand nombre de capsides icosaédriques (4/5e des structures enregistrées dans VIPERdb) et se retrouve dans nombre de familles (26 sur les 38 de VIPERdb), ces familles pouvant être aussi différentes que les Adenoviridae, les Reoviridae ou les Circoviridae. Historiquement, le jelly-roll a été le seul motif structural observé dans les capsides icosaédriques pendant les 12 premières années de la cristallographie des virus. Les 2 premières structures connues à une résolution atomique furent des virus à ARN simple brin de plantes mais il a ensuite été observé dans des virus humains : rhinovirus et poliovirus. L'organisation de ces premières capsides était relativement simple avec T3 mais depuis les jelly-rolls ont été retrouvés dans la capsid d'un virus à DNA double brins ayant un diamètre d'environ 1000Å et T=25. De plus les jelly-rolls apparaissent parfois isolément et parfois en tandem sur les chaînes peptidiques suite à un ou plusieurs événements de duplication/fusion de gène. Nous proposons ici une classification des jelly-rolls viraux basée essentiellement sur leur structure 3D et discuterons des implications éventuelles sur les virus et familles virales les contenant alors même que certaines ne présentent pas ou très peu de similarités de séquences.

P80

Diversité moléculaire et fonctionnelle des polysaccharidases associées aux phages marins

Pierre-Yves Mocaer¹, Robert Laroque², Florian Lelchat¹, Mirjam Czjzek², Gurvan Michel², Anne-Claire Baudoux¹

¹ Adaptation et diversité en milieu marin, CNRS UMR7144, France

² Laboratoire de biologie intégrative des modèles marins, CNRS UMR8227, France

<anne-claire.baudoux@sb-roscoff.fr>

Au cours des dernières décennies, les polysaccharidases associées aux bactériophages ont fait l'objet d'un nombre considérable d'études. Ces enzymes, principalement localisées sur la queue des phages, interviennent

dans les premières étapes de l'infection [1, 3]. Elles permettent en effet aux phages de dépolymériser la capsule d'exopolysaccharides/biofilm excrété par l'hôte, permettant ainsi d'accéder aux récepteurs primaires de la bactérie. La spécificité de substrat de ces enzymes serait, pour certains, directement liée à la spécificité d'hôte des virus [4]. À ce jour, la description de ces polysaccharidases ne concerne que quasi-exclusivement les phages terrestres [2]. Comparativement, il n'existe aucune étude sur l'existence de polysaccharidases associées aux virus marins. L'analyse des génomes viraux marins ne révèle par ailleurs aucune trace de polysaccharidases (excepté les lysozymes), malgré leur grande diversité chez les autres organismes (*cf.* base de données CAZY). Les bactéries marines sont toutefois connues pour être d'importants producteurs d'exopolysaccharides. Il est donc probable que les phages marins utilisent ces enzymes pour infecter leurs hôtes. Dans cette étude, une collection de phages marins a été criblée à la recherche d'activités polysaccharidases sur des exopolysaccharides isolés de leurs hôtes respectifs. Deux phages ont été sélectionnés, séquencés, annotés, et une vingtaine de gènes candidats ont été surexprimés. Les protéines produites ont été purifiées et celles possédant des activités de dépolymérisation ont été caractérisées. Nous présentons ici les premières descriptions de polysaccharidases chez les virus marins. Nous suspectons que les caractéristiques biochimiques de ces enzymes (temps de vie, spécificité, activité) et leur habileté à résister aux changements environnementaux (température, pH...) pourraient directement influencer les traits biologiques des virus dans l'environnement marin.

1. Bayer E, Thurow H & Bayer MH. *Virology* 1979 ; 94 : 95-118.
2. Cornelissen A, *et al.* *Virology* 2012 ; 434 : 251-6.
3. Latka A, *et al.* *Applied Microbiology and Biotechnology* 2017 ; 101: 3103-19.
4. Leiman, PG *et al.* *Journal of Molecular Biology* 2007 ; 371 : 836-49.

P93

Étude structurale et fonctionnelle des régions non traduites de Flaviviridae et Picornaviridae au moyen d'une méthode innovante de prédiction de structure secondaire d'ARN

Delphine Allouche¹, Afaf Saaidi^{2,3}, Yann Ponty^{2,3}, Bruno Sargueil¹
¹ Laboratoire de cristallographie et RMN biologiques (LCRB, UMR 8015) Université Paris Descartes-Paris 5, CNRS, Faculté des sciences pharmacologiques et biologiques, 4, av. de l'Observatoire 75270 Paris cedex 06, France
² Inria Saclay-Île de France, 1 rue Honoré d'Estienne d'Orves, Bâtiment Alan Turing, Campus de l'École polytechnique 91120 Palaiseau, France
³ Laboratoire d'informatique de l'École polytechnique [Palaiseau] (L'X), Route de Saclay 91128 Palaiseau cedex, France
 <bruno.sargueil@parisdescartes.fr>

Afin de promouvoir leur propagation, les virus utilisent des mécanismes spécifiques pour produire rapidement leurs protéines. Ceux-ci consistent d'une manière ou d'une autre à détourner la machinerie traductionnelle de la cellule hôte. Pour nombre de virus à ARN, ce détournement se fait grâce à la présence dans la région 5' non traduite d'éléments structuraux, permettant de recruter à proximité de ou directement sur le codon initiateur la machinerie traductionnelle. Ces déterminants structuraux sont appelés site d'entrée interne du ribosome ou IRES. Il existe quatre grands groupes d'IRES classés en fonction de la structure de l'ARN viral, du jeu de protéines cellulaires qu'il fait intervenir et des mécanismes moléculaires mis en jeu. Les IRES de type III, dont l'archétype est l'IRES du virus de l'hépatite C humaine (HCV), ont été identifiés chez des virus des familles des *Flaviviridae* mais aussi des *Picornaviridae*. Certaines de ces IRES présentent une structure comparable à celle de l'IRES d'HCV à l'exception d'un sous-domaine supplémentaire appelé IIIId2. Des études précédentes ont montré que la délétion de ce sous-domaine inhibe totalement la traduction

IRES dépendante sans pour autant affecter la liaison de la petite sous unité du ribosome. Nos travaux visent à déterminer expérimentalement le rôle du domaine IIIId2, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la traduction virale et notamment celle du HCV. Pour se faire, au moyen d'une nouvelle stratégie de prédiction de structure d'ARN développée au laboratoire, nous avons modélisé la structure de plusieurs de ces IRES et des mutants correspondants ne comportant pas le domaine IIIId2. Ceci nous a permis de montrer que la délétion de ce sous-domaine ne perturbe pas la structure globale de l'IRES. En prenant l'empreinte du ribosome sur l'ARN viral, nous avons montré que ce domaine est en contact avec le ribosome. À présent, nous cherchons à définir les remaniements structuraux du ribosome provoqué par la liaison de l'IRES afin de comprendre pourquoi l'absence du domaine IIIId2 bloque la progression des complexes de pré-initiation de la traduction. Enfin, nous déterminerons la composition protéique de ces complexes et reconstituerons la cascade des événements moléculaires *in vitro* à partir d'éléments purifiés.

Angulo J *et al.*, *Nucleic Ac Research* 2015.
 Willcocks MM *et al.*, *Nucleic Ac Research* 2017.

P94

Bases structurales de la reconnaissance des membres du LDL-Récepteur par la glycoprotéine du VSV

Laura Belot¹, Jovan Nikolic¹, Hélène Raux¹, Pierre Legrand², Yves Gaudin¹, Aurélie Albertini¹
¹ Institut de biologie intégrative de la Cellule, CNRS, France
² Synchrotron Soleil (SSOLEIL) CNRS URI, L'Orme des Merisiers Saint-Aubin, BP 48, 91192 Gif-sur-Yvette cedex, France
 <aurelie.albertini@i2bc.paris-saclay.fr>

Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est le prototype du genre Vesiculovirus de la famille des *Rhabdoviridae* ; il est également connu comme étant un virus oncolytique et sa glycoprotéine G est par ailleurs souvent utilisée pour pseudotyper d'autres virus dans le cadre de différentes applications (biotechnologie et médecine).

VSV G est une protéine transmembranaire qui assure l'attachement du virus à son récepteur cellulaire et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome dans lequel le virus a été internalisé. Le récepteur aux lipoprotéines de faibles densités (LDL-R) est impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et sert également de récepteur majeur pour l'entrée du VSV. Pour élucider l'interaction complexe entre le virus et son récepteur, nous avons combiné différentes techniques pour comprendre les bases moléculaires de l'interaction entre G et le LDL-R. Pour cela nous avons réalisé une étude structurale et fonctionnelle de VSV G en complexe avec le LDL-R. Le domaine de fixation du ligand de LDL-R est constitué de 7 domaines riches en cystéine (notés CR1 à CR7). Nous avons purifié ces 7 domaines séparément et montré que G est capable de lier deux de ces domaines CR: CR2 et CR3. Nous avons également caractérisé l'interaction entre G et CR2 et entre G et CR3 et résolu les structures cristallographiques de VSV G en complexe avec CR2 et en complexe avec CR3. Ces structures ont révélé que le site d'interaction de CR2 et CR3 sur G sont identiques. G engage les mêmes résidus basiques pour lier les domaines CR dans chaque structure. De plus nous avons réalisé des tests d'interaction et d'infectiosité en utilisant des G mutantes pour les résidus impliqués dans l'interaction. Ces expériences montrent que même si VSV peut utiliser des récepteurs alternatifs, la mutation de ces résidus basiques sur G empêche l'infection par VSV. Nos données indiquent que les seuls récepteurs du VSV sont des membres de la famille des LDL-R et que VSV G a évolué pour interagir avec leurs domaines CR. Nous avons ainsi caractérisé de manière fine l'interaction entre VSV G et ses récepteurs cellulaires ce qui nous donne des bases pour la conception de glycoprotéines recombinantes présentant un tropisme altéré.