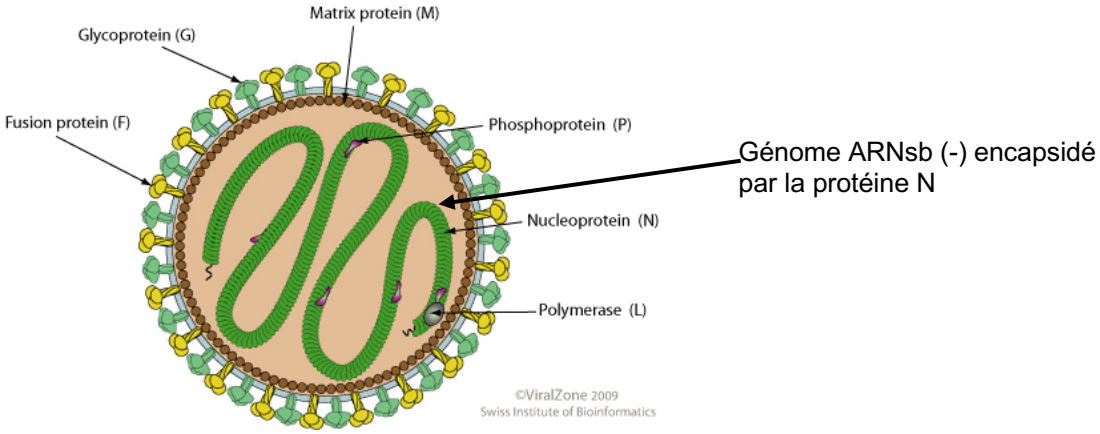
SUJET VIROLOGIE (Durée : 1 heure)

TOUTES VOS <u>REPONSES</u> DOIVENT ETRE <u>JUSTIFIEES.</u>

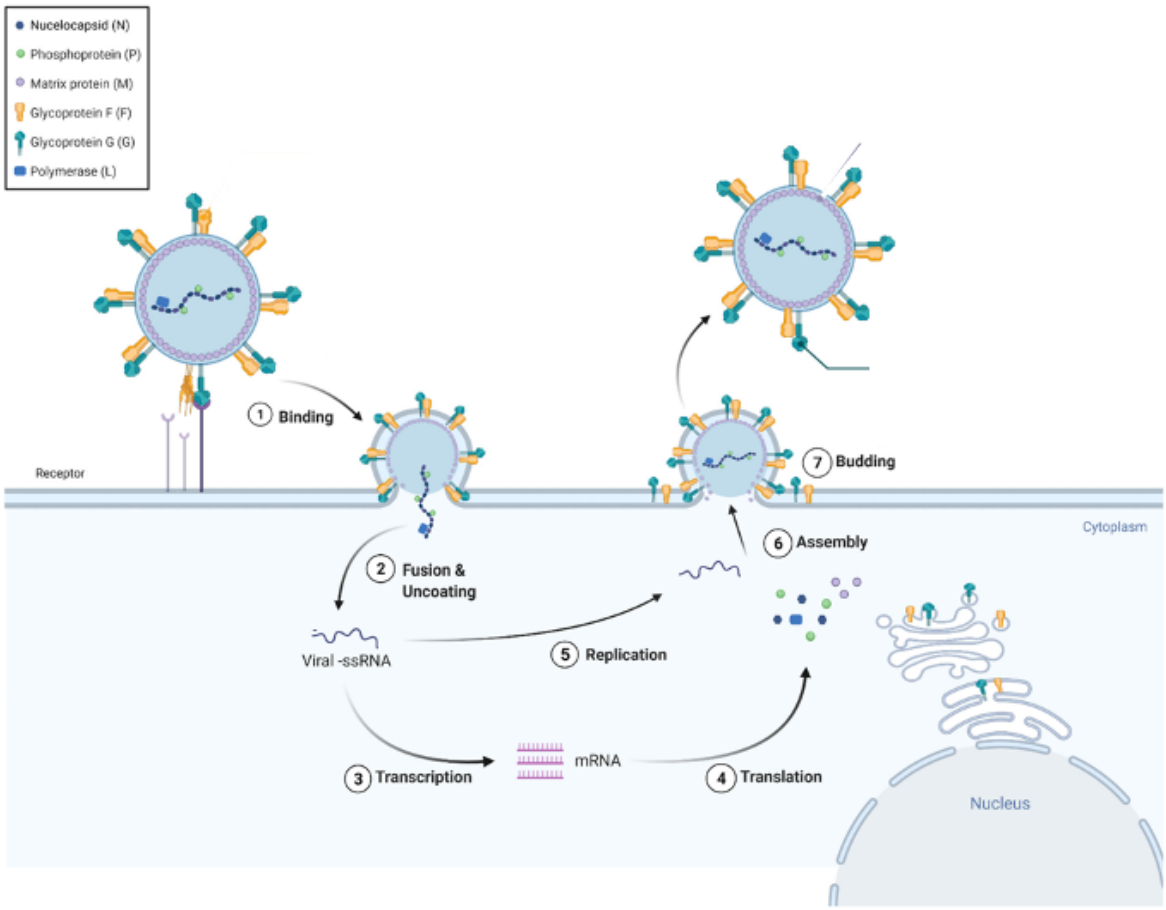
Le virus Nipah (NiV), identifié en 1999, est un virus émergent responsable d'encéphalites mortelles chez 70% des patients infectés. Il appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, virus enveloppé à ARN simple brin négatif.

Le génome de ces virus code pour 5 protéines principales : deux protéines d'enveloppe (la glycoprotéine G et la protéine de fusion F), la protéine de matrice M, la protéine de capside (nucléoprotéine N), la polymérase virale L et son co-facteur la protéine P. La capside présente une symétrie de type hélicoïdale. L'entrée de ces virus met en jeu une fusion à la membrane plasmique.

Q1 (1 point) : Sous forme d'un schéma légendé, présentez la structure du virus NiV.



Q2 (2,5 points) : A l'aide d'un schéma légendé, décrivez les principales étapes du cycle de multiplication d'un tel virus.



Afin de caractériser le récepteur de ce virus, les chercheurs ont produit de manière recombinante, deux protéines de fusion :

- La protéine NiV-G-Fc composée de l'ectodomaine (partie extracellulaire) de la glycoprotéine G fusionné à la portion Fc d'une immunoglobuline G (IgG humaine)
- La protéine NiV-G-HA composée de l'ectodomaine (partie extracellulaire) de la glycoprotéine G fusionné au peptide HA (9 acides aminés).

Dans l'expérience 1**,** la fixation de la protéine NiV-G-Fc à la surface de cellules, permissives ou non au NiV, a été analysée (Figure 1).

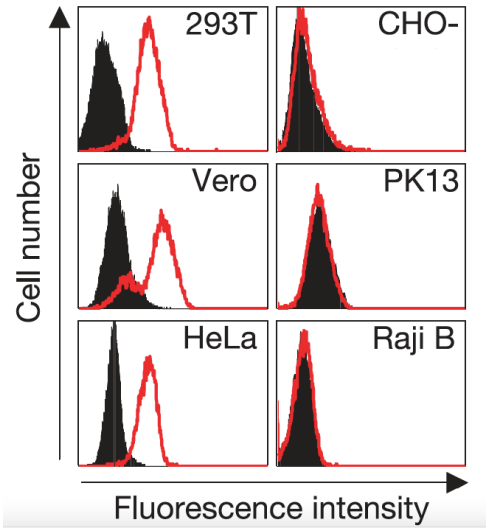


Figure 1 : Des quantités équivalentes de NiV-G-Fc (ligne épaisse) ou de Fc seul (histogramme plein) ont été incubées avec des cellules 293T, Vero, HeLa, cellules CHO, PK13 ou Raji. Puis les cellules ont été lavées et incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG humaine conjugué à de la phycoérythrine (PE). A la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées et les intensités de fluorescence ont été analysées à l'aide d'un cytomètre de flux.

Q3 (1,5 points) : **Décrivez et analysez les résultats présentés dans la figure 1. Selon toute vraisemblance, quelles sont les cellules sensibles et permissives au NiV ?**

L'objectif de cette expérience est d'examiner la fixation de la protéine NiV-G à la surface de divers types cellulaires. Pour cela, les expérimentateurs ont incubé les cellules avec la protéine NiV-G-Fc, puis avec un anticorps anti-Fc couplé à un fluorochrome. Si la protéine NiV-G-Fc est fixée à la surface des cellules, alors les cellules seront fluorescentes. La fluorescence est mesurée ici à l'aide d'un cytomètre de flux et les intensités de mesurées sont présentées dans la figure 1. A titre de contrôle, les cellules ont été incubées avec un Fc : cette protéine ne se fixe pas de manière spécifique sur les cellules. La fluorescence mesurée avec cette protéine représente le bruit de fond (ou fluorescence non spécifique).
Description des résultats : avec les cellules CHO, PK13 et Raji B, l'intensité de fluorescence mesurée est identique pour Fc et NiV-G-Fc donc la protéine NiV-G-Fc ne se fixe pas à la surface de ces cellules.
Avec les cellules 293T, Vero et HeLa, l'intensité de fluorescence mesurée est significativement supérieure avec NiV-G-Fc par rapport à Fc seul donc la protéine NiV-G-Fc se fixe à la surface de ces cellules.
La protéine NiV-G est la protéine d'enveloppe du virus NiV, il s'agit de la protéine virale impliquée dans l'attachement aux cellules cibles. Dans la mesure où cette protéine se fixe à la surface des cellules 293T, Vero et HeLa, mais pas à la surface des CHO, PK13 et Raji B, selon toute vraisemblance (*mais ce n'est pas démontré ici*) les cellules 293T, Vero et HeLa sont des cellules sensibles. Ce sont éventuellement des cellules permissives au virus, mais pour prouver cela il faudrait tester la capacité du virus à se multiplier dans ces cellules.

Par des approches biochimiques non décrites ici, les chercheurs ont identifié la protéine membranaire ephrinB2 parmi les protéines cellulaires co-précipitées avec la protéine NiV-G-Fc.

Dans l'expérience 2, un test ELISA a été mis en œuvre comme suit : des protéines ephrinB1-Fc et ephrinB2-Fc ont été incubées (séparément) dans des plaques recouvertes d'anticorps anti-Fc humains. Après lavages, une solution de protéines NiV-G-HA a été ajoutée à chaque puits. A l'issue de l'incubation, les puits ont été lavés et une solution d'anticorps anti-HA conjugué à la HRP a été ajoutée. Enfin, après une dernière série de lavages, une solution d'OPD (substrat de la HRP) a été ajoutée. Après arrêt de la réaction, l'absorbance a été mesurée à 490 nm. Les résultats sont présentés dans la Figure 2.

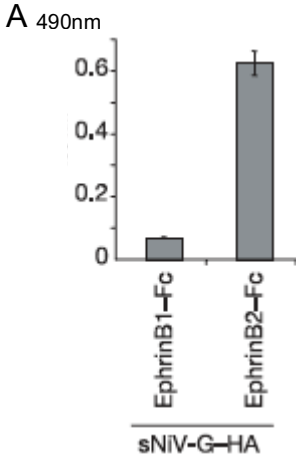


Figure 2 : Un test ELISA a été réalisé avec les molécules suivantes :
- Des anticorps anti-IgG humaine (anti-Fc),
- Des protéines de fusion ephrinB1-Fc et ephrinB2-Fc composées respectivement de la partie extracellulaire des protéines ephrinB1 et ephrinB2 fusionnées à la portion Fc d'une immunoglobuline G humaine,
- La protéine chimère NiV-G-HA,
- Des anticorps anti-peptide HA couplés à la HRP (Peroxydase).

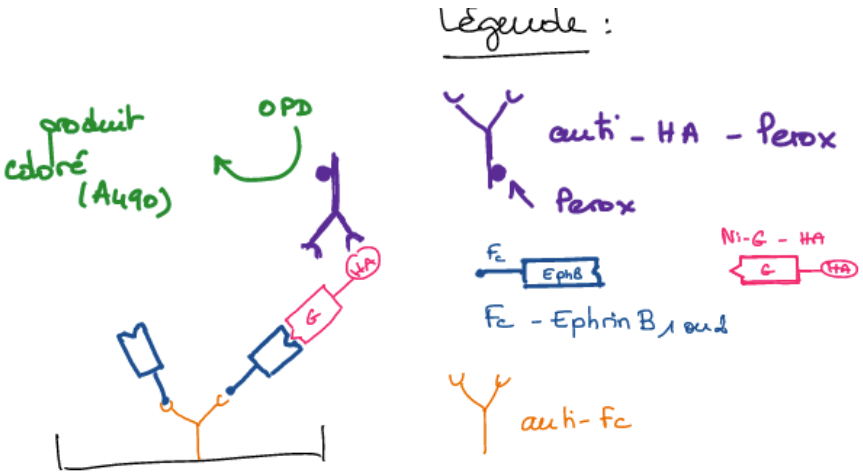
Rq : ephrinB1 et ephrinB2 sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface de divers types cellulaires. Au sein de cette famille de protéines, l'éphrine B1 est l'éphrine la plus proche de l'éphrine B2.

Q4 (1 point) : Expliquez à l'aide d'un schéma le principe du test ELISA mis en œuvre et précisez quel est l'objectif de cette expérience. Analysez les résultats obtenus.

(Rq : cette question a été notée sur 1,5 point)

L'objectif de cette expérience est de mesurer la capacité des protéines ephrinB1 et ephrinB2 à interagir (se fixer) à la protéine NiV-G

Le principe du test ELISA est le suivant :



Les résultats présentés montent une Abs inférieure à 0,1 UA avec l'ephrinB1 contre 0,6 UA avec l'ephrinB2, donc la protéine NiV-G-HA ne se fixe pas (ou très peu) à l'EphrinB1 mais se fixe bien à l'ephrinB2

Conclusion : la protéine d'enveloppe du NiV est capable de se fixer sur la protéine de surface cellulaire ephrinB2. L'ephrinB2 se présente donc comme un récepteur de ce virus.

Expérience 3 : les chercheurs ont utilisé des particules virales dérivées du VSV [1] dites « pseudotypées ». Ces particules présentent au niveau de leur enveloppe les protéines d'enveloppe G et F du NiV, mais sont dépourvues de la protéine d'enveloppe naturelle du VSV. De plus, ces virus VSV pseudotypés sont recombinants : le gène codant pour une protéine fluorescente rouge (RFP) a été inséré dans le génome**.** Les expériences réalisées avec ces virus VSV-RFP pseudotypés avec Ni-F/G sont présentées dans la Figure 3.

[1] VSV : Virus de la Stomatite Vésiculeuse, virus enveloppé à ARN négatif non segmenté. Le large tropisme cellulaire de ce virus en fait un virus modèle pour de nombreuses applications de recherche fondamentale.

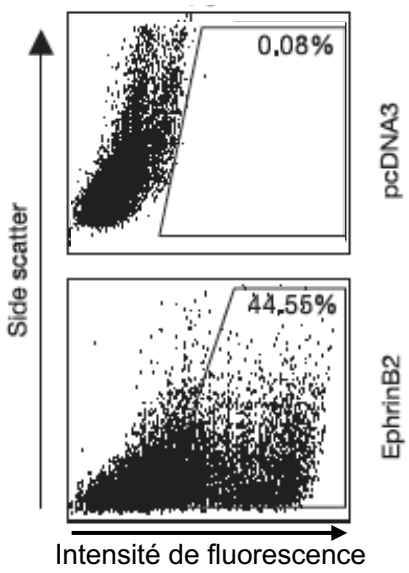


Figure 3A : Les cellules CHO ont été transfectées avec un plasmide d'expression de l'ephrinB2 ou un plasmide contrôle (pcDNA3) et infectées par le VSV-RFP pseudotypé NiV-F/G. La production de RFP a été analysée par cytométrie en flux 24 h post-infection. Le pourcentage de cellules RPF positives est précisé pour chaque condition.

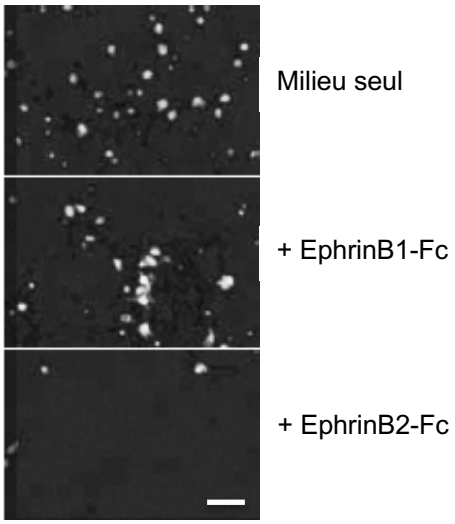


Figure 3B : Des virus VSV-RFP pseudotypés NiV-F/G ont été utilisés pour infecter des neurones en présence ou en l'absence d'ephrinB1-Fc ou d'ephrinB2-Fc (10 mg/ml). Les cellules ont été analysées par microscopie de fluorescence 24hrs post-infection. (Barre d'échelle : 20µm).
Rq : les neurones sont sensibles et permissifs au NiV.

Q5 (1,5 points) : Après avoir précisé l'objectif de cette expérience, vous décrirez et analyserez les résultats présentés dans la figure 3A.
Pour cette expérience, les chercheurs auraient-ils pu utiliser des cellules 293T (cf figure 1) ? (Expliquez).

On cherche ici à tester l'hypothèse que EphrinB2 est un récepteur du virus = protéine de surface qui permet l'attachement et l'entrée du virus. Pour cela, on utilise des cellules résistantes (CHO) auxquelles on fait exprimer la protéine candidate en les transfectant avec l'ADNc codant pour cette protéine. A titre de contrôle on utilise des cellules CHO transfectées avec un vecteur vide. Si l'EphrinB2 est bien un récepteur du virus, alors les CHO-EphrinB2 seront sensibles.
La sensibilité des cellules est évaluée à l'aide d'un virus VSV recombinant codant pour la RFP et pseudotypé avec la protéine d'enveloppe NiV-G. La fluorescence rouge (RFP) sera un indicateur de l'entrée des virions dans les cellules (entrée suivie de l'expression du génome)
Les résultats présentés dans la figure 3A montrent que les cellules CHO-pcDNA3 sont résistantes (0,08% de cellules RFP+) alors que les cellules CHO-EphB2 sont sensibles (44,5% RFP+).
Conclusion : l'expression de l'ephrinB2 à la surface des CHO rend ces cellules sensibles ; ephrinB2 est donc suffisante pour l'attachement et l'entrée des virions.
Les cellules 293T étant des cellules sensibles (cf Q3), cette expérience n'aurait pas pu être effectuée avec ces cellules puisqu'elles expriment le récepteur qui permet l'attachement et l'entrée des virions.

Q6 (1,5 points) : Après avoir précisé l'objectif de cette expérience, vous décrirez et analyserez les résultats présentés dans la figure 3B.

On cherche ici à confirmer que l'ephrinB2 est bien le récepteur du virus en réalisant une expérience de compétition. Pour cela, on utilise des cellules sensibles (ici des neurones). Les infections avec les VSV-RFP-NiV-G sont réalisées en absence ou en présence de protéines EphrinB1 ou B2 solubles.

Comme dans l'expérience précédente, les cellules infectées seront fluorescentes (expression de la RFP). Ainsi, en présence d'une protéine qui ne se fixe pas sur les virions, on observera une infection, mais une protéine capable de se fixer sur les virions inhibera alors l'infection.
Figure 3B : en présence de milieu seul (contrôle), détection de cellules fluorescentes donc infectées (contrôle positif : c'est attendu car les neurones sont sensibles au virus). L'ajout d'ephrinB1 ne change rien, par contre en présence d'ephrinB2 les cellules ne sont pas fluorescentes. Dans cette dernière condition, les cellules ne sont donc pas infectées. Ceci montre qu'il y a bien compétition entre l'ephrinB2 soluble et le récepteur cellulaire du virus : EphrinB2 est donc un récepteur du virus.

Proposez une expérience similaire permettant de confirmer ce résultat.
Une expérience de compétition aurait pu être faite en utilisant des anticorps dirigés contre l'ephrinB2, avec comme contrôles des anticorps dirigés contre l'ephrinB1 (ou irrelevants)

Q7 (1 point) : Ces travaux ont fait l'objet d'un article scientifique dont le titre est « *EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus* ». Au vu des résultats présentés (expériences 1 à 3), approuvez-vous ce titre ? Argumentez votre réponse.

Oui, car :

- La protéine NiV-G est capable de se fixer sur l'EphrinB2 (fig 2)
- L'expression de l'EphrinB2 à la surface de cellules résistantes rend les cellules sensibles au virus (fig3A)
- La forme soluble de l'EphrinB2 entre en compétition avec le récepteur du virus(fig3B) pour l'attachement et l'entrée du virus dans des cellules sensibles.

Sujet très librement inspiré de Negrete et al., Nature, 2005.