

### L3 Immunologie-virologie, 2021/22, 1ere session

#### Sujet de virologie

(les sujets immunologie et virologie ont le même coefficient pour la note finale de l'UE)

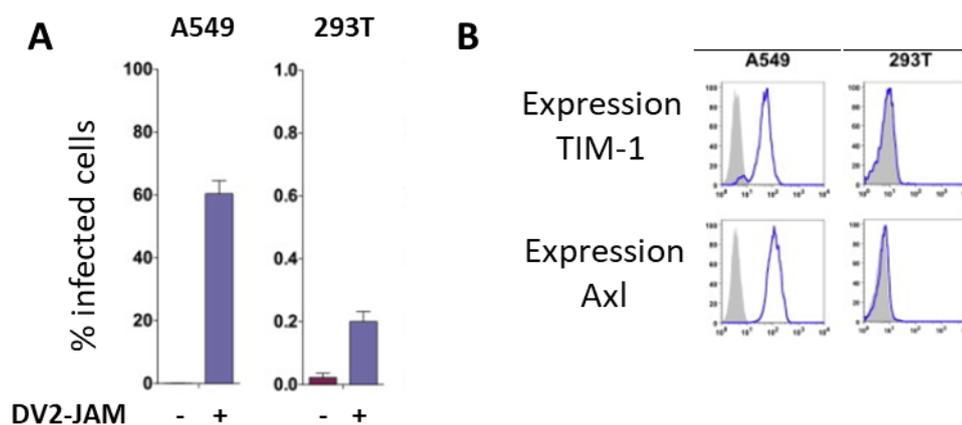
Etude du mécanisme d'entrée du virus de la Dengue (total 40 points)

→ Répondre aux questions de manière synthétique, en veillant à décrire les contrôles.

Le virus de la Dengue (DV) est un virus enveloppé du groupe IV (classification de Baltimore) qui cause un large spectre de pathologies, allant d'une fièvre légère à la dengue hémorragique potentiellement mortelle et au syndrome de choc de la dengue. Malgré une importance grandissante du DV en tant qu'agent pathogène humain (>2,5 milliards de personnes exposées), il n'existe actuellement aucun vaccin ou traitement antiviral efficace.

L'entrée du DV dans la cellule hôte est un déterminant majeur du tropisme et de la pathogenèse virale. Elle représente donc une cible prometteuse pour les stratégies antivirales visant à bloquer l'infection. Pour cette raison, des nombreuses études récentes ont porté sur la compréhension du mécanisme moléculaire de l'entrée du DV dans la cellule hôte.

Initialement les cellules épithéliales d'adénocarcinome humain (A549) et les cellules épithéliales de rein humain (HEK 293T) ont été infectées avec la souche DV2-JAM (Figure 1A). Sur la base des résultats obtenus, ces dernières ont été sélectionnées pour réaliser un criblage gain de fonction. Ainsi, les 293T ont été transfectées avec une banque d'ADN codants pour des protéines transmembranaires humaines, puis elles ont été infectées avec le DV2-JAM. A l'issue de ce criblage, les protéines TIM-1 et Axl sont ressorties comme des facteurs pouvant faciliter l'infection. Avant de poursuivre les analyses fonctionnelles, les chercheurs ont mesuré l'expression de TIM-1 et Axl à la membrane plasmique de ces deux lignées cellulaires humaines (Figure 1B).



**Figure 1. Infection de lignées cellulaires humaines avec le DV et expression de TIM-1 et Axl.** A) les cellules indiquées ont été incubées avec le virus DV2-JAM puis la synthèse de la protéine virale NS1 a été mesurée après 24 h par cytométrie en flux pour évaluer le pourcentage de cellules infectées. B) les niveaux d'expression des protéines TIM-1 et Axl à la surface des cellules A549 et HEK 293T a été quantifié par cytométrie en flux (ligne bleue). La zone grisée représente le marquage avec un anticorps contrôle.

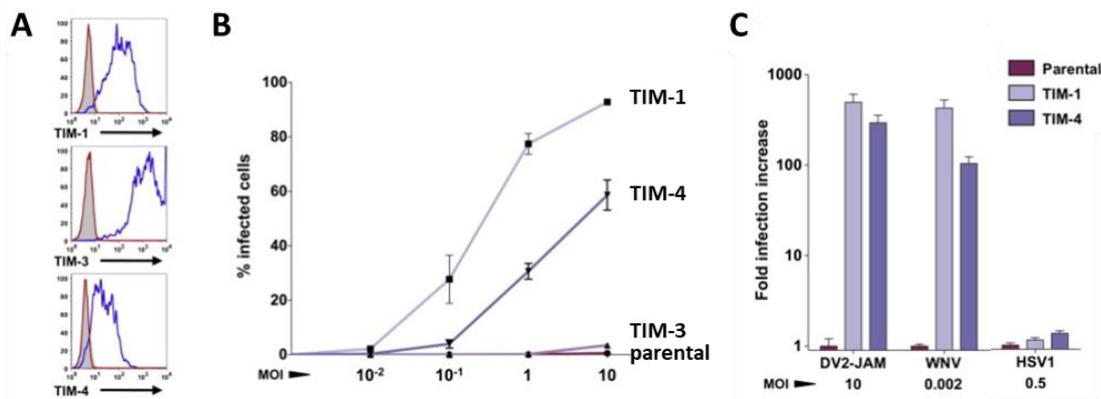
**Question 1.** Décrire le résultat de la figure 1A. Pourquoi les cellules HEK 293T ont été choisies pour réaliser le criblage gain de fonction ? **4 points**

Dans la condition contrôle (- DV2-JAM) il n'y a pas de cellules infectées (**1 pt**). Des taux d'infection élevés (~60%) sont obtenus avec les cellules A549, des %d'infection faibles (~0.2) avec les HEK 293T (**1 pt**). Les A549 sont permissives au DV, les HEK 293T sont résistantes (**1 pt**). Ainsi ces dernières ont été choisies pour réaliser le crible gain de fonction (**1 pt**).

**Question 2.** Décrire le résultat de la figure 1B. En quoi ce résultat conforte l'hypothèse d'un rôle de TIM-1 et Axl comme potentiels récepteurs viraux ? **3 points**

Le marquage avec l'anticorps contrôle (zone grisée) permet de définir le bruit de fond lié à sa fixation aspécifique. Les tracés gris (contrôle) et bleu/noir, indiquant le niveau d'expression de TIM-1 et Axl, se superposent dans les cellules 293T, ce qui veut dire que ces cellules n'expriment pas ces protéines (**1 pt**). Dans le cas des A549, le tracé bleu/noir est décalé vers la droite indiquant que les deux protéines sont exprimées à la surface de la cellule (**1 pt**). Il y a donc une corrélation entre l'expression des récepteurs putatifs et la susceptibilité des cellules à l'infection (**1 pt**).

Pour comprendre le rôle de TIM-1 et d'autres protéines de la même famille dans le cycle de réplication du DV, les chercheurs les ont exprimées de manière transitoire par transfection dans les cellules 293T (**Figure 2A**). Celles-ci ont été ensuite infectées avec la souche DV2-JAM (**Figure 2B**). Des infections ont aussi été réalisées avec le Virus du Nil Occidental (WNV), qui comme le DV appartiennent au groupe IV, ou le Virus de l'Herpès Simplex de type 1 (HSV-1), appartenant au groupe I (**Figure 2C**).



**Figure 2. Effet de la surexpression des protéines TIM sur l'infection virale. A)** les cellules 293T transfectées avec un plasmide codant TIM-1, -3 ou -4 ont été marquées avec un anticorps polyclonal anti-TIM puis analysées par cytométrie en flux (ligne bleue). La zone grisée représente le marquage des cellules non transfectées. **B)** Les mêmes cellules 293T transfectées ont été infectées soit avec la souche DV2-JAM à différentes multiplicités d'infection (m.o.i.) **C)** soit avec le WNV ou le HSV-1. Le taux d'infection a été déterminé en mesurant l'expression de protéines virales par cytométrie en flux.

**Question 3.** Décrivez le résultat de la figure 2A, 2B et 2C, puis faites une conclusion. **6,5 points**

A) Les cellules parentales 293T n'expriment aucune des protéines TIM à des taux détectables (**1 pt**) (comme montré dans la figure 1B). La transfection permet d'obtenir une expression de TIM-3 > TIM-1 > TIM-1 (**1 pt**).

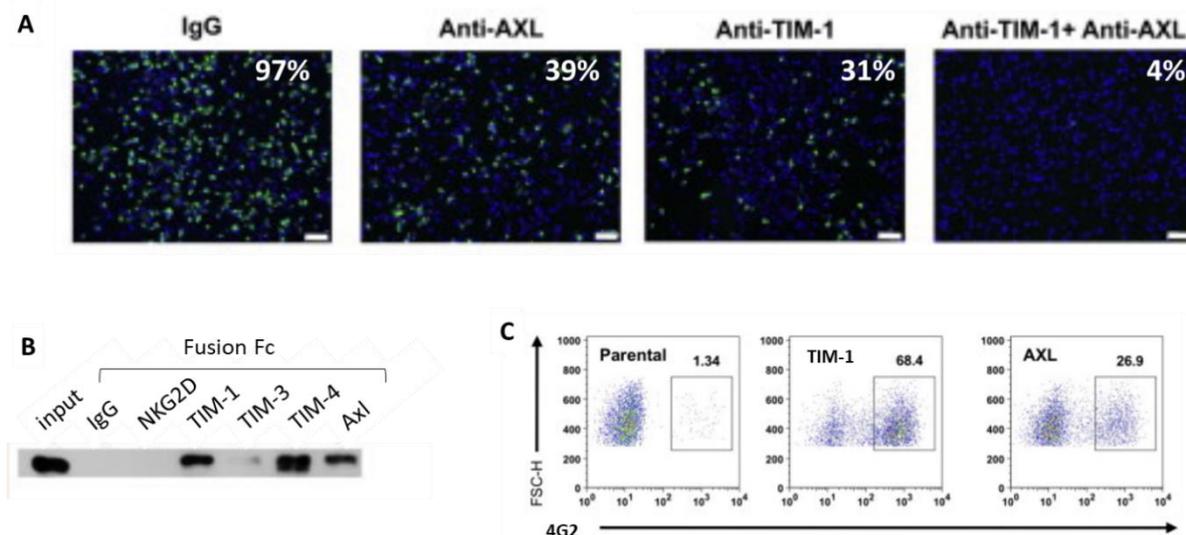
- B) Les cellules parentales 293T ne sont pas susceptibles à l'infection par le DV (1 pt). Lors que TIM-1 ou -4 est surexprimé, le % de cellules infectées par le DV augmente avec le moi. Ce n'est pas le cas pour les cellules surexprimant TIM-3 (1 pt), ce résultat n'étant pas la conséquence d'un manque d'expression de TIM-3 (0,5 pt).
- C) La sur-expression de TIM-1 ou -4 augmente l'infection par d'autres virus du groupe IV (virus ARN simple brin polarité +) (1 pt) mais pas le HSV-1 (virus ADN db). Donc TIM 1 et 4 pourraient jouer le rôle de récepteurs pour les virus du groupe IV mais pas du groupe I. (1 pt)

**Question 4.** Donnez la définition de « m.o.i. ». 2 points. Rapport entre nombre de particules virales et nombre de cellules cibles.

**Question 5.** Sur quelles caractéristiques virales est basé la classification de Baltimore. Qu'est-ce qu'un virus du groupe IV ? Et du groupe I ? 4 points

- La classification de Baltimore se base sur la nature du génome viral (1 pt) et son mode de réplication (1 pt) (et produire La molécule d'ARNm qui est traduite pas les ribosomes de l'hôte).
- Les virus du groupe I ont un génome ADN (0.5 pt) double brin (0.5 pt)
- Les virus du groupe IV un génome ARN (0.5 pt) simple brin + (0.5 pt)

Dans un deuxième temps les chercheurs ont étudié l'impact d'une exposition des cellules A549 à des anticorps anti-TIM-1 et/ou anti-Axl, avant l'infection virale (Figure 3A). Ils ont également analysé l'interaction entre les particules virales du DV et les protéines TIM ou Axl soit purifiées (Figure 3B) soit exprimées de manière transitoire à la surface des cellules HEK 293T transfectées (Figure 3C).



**Figure 3. Analyse de l'interaction entre les récepteurs putatifs et le DV.** **A)** Les cellules A549 ont été incubées avec des anticorps anti-Axl et/ou anti-TIM-1 avant d'être incubées avec le DV2-JAM pendant 1 h à 4°C. Après lavage pour éliminer les virus non fixés, les cellules ont été marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine virale NS1 (signal blanc) et du DAPI pour visualiser le noyau (signal bleu), puis elles ont été observées au microscope à fluorescence. Le pourcentage de cellules exprimant NS1 est indiqué. **B)** Les particules de DV ont été incubées avec les protéines indiquées, immobilisées sur des billes d'agarose. Les particules virales co-précipitées ont été visualisées par immunoblot avec un anticorps dirigé contre la protéine E (4G2) de l'enveloppe virale suivi d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase puis d'une révélation par chimiluminescence. **C)** Les lignées cellulaires HEK 293T transfectées avec un plasmide codant TIM-1 ou Axl ont été incubées avec le DV2-JAM pendant 1 h à

4°C, puis elles ont été marquées avec un anticorps anti-protéine E (4G2) couplé à un fluorochrome et ont été analysées par cytométrie en flux.

*Question 6. Pourquoi les cellules ont été incubées avec le DV2-JAM pendant 1 h à 4°C (Figure 3A et 3C) ? (Étape de l'infection virale évaluée) 1,5 points*

Pour empêcher l'entrée du virus et ne détecter que les virus associés à la membrane plasmique.

*Question 7. Décrivez les résultats de la figure 3A, 3B et 3C, puis donnez une conclusion générale.*

8,5 points

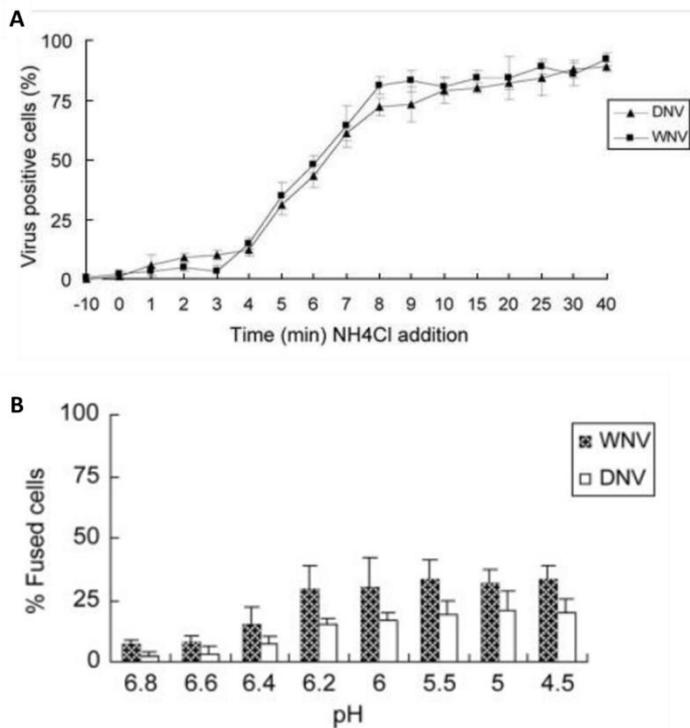
- A. L'interaction du virus avec les récepteurs putatifs est étudiée par une approche de compétition. 97% des cellules A549 (sensibles !) présentent un marquage NS1 (indiquant que le virus est rentré) en présence d'un anticorps relevant/contrôle (1 pt). Le nombre de cellules NS1+ diminue si les cellules sont préalablement exposées à un anticorps anti-Axl (39%) ou anti-TIM-1 (31%) (1 pt). En présence des deux anticorps anti-Axl et anti-TIM-1 seulement 4% des cellules sont NS1+ (0.5 pt). Cela montre que les deux récepteurs sont indispensables pour l'entrée du DV (0.5 pt).
- B. L'input est un contrôle positif, les billes couplées avec le Fc fusionné à IG ou NKG2D les contrôles négatifs (1 pt) Le virus interagit avec les billes couplées avec TIM-1, -4 et Axl, mais pas TIM-3 (1 pt). Le virus ne coprecipite pas avec les billes couplées à IgG et NKG2D, utilisés comme contrôles négatifs (0.5 pt).
- C. Pas de détection de la protéine E virale dans les cellules parentales 293T (résistantes, n'exprimant ni TIM-1 ni Axl) (1 pt). 68% des cellules 293T exprimant TIM-1 et 27% des cellules exprimant Axl sont positives pour E (1 pt).

Ces observations confirment le rôle de TIM-1 et Axl en tant que récepteurs du DV (1 pt).

*Question 8. Donnez un à deux autres approches expérimentales permettant de valider l'interaction directe entre les particules virales et les protéines TIM-1 et Axl.*

2 points. ELISA, siRNA

Pour aller plus loin dans la compréhension du mécanisme d'entrée du DV, les chercheurs ont étudié les conséquences de l'acidification du compartiment endosomal. Ils ont donc analysé l'effet de l'ajout du chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) dans le milieu de culture à différents temps de l'infection par le DV ou le WNV (Figure 4A). Ils ont aussi effectué un test de « fusion cellule - cellule induite par le virus » pour déterminer la valeur seuil du pH nécessaire pour l'entrée virale (Figure 4B).



**Figure 4. Implication du pH dans l'entrée du DV. A)** Les cellules A549 ont été pré-incubées avec le DV ou le WNV 1h à 4°C. Elles ont été exposées au NH<sub>4</sub>Cl à différents temps avant ou après d'être transférées à 37°C. Le taux d'infection a été mesuré comme indiqué précédemment par cytométrie en flux. **B)** Des cellules pré-incubées à 4°C avec le virus ont été mélangées avec des cellules cibles marquées avec un colorant fluorescent, puis elles ont été placées pendant 5 minutes à 37°C dans un tampon au pH indiqué (de 6,8 à 4,5). Après lavage des cellules, les noyaux ont été marqués et les cellules ont été observées au microscope de fluorescence pour définir le taux de fusion.

Pour rappel : pH endosome précoce = ~6,3 ; pH endosome tardif = ~5,5 ; pH lysosome = ~4,7 ;

*Question 9. Décrire le résultat de figure 4A et 4B. Quelle conclusion pouvez-vous faire ?*

4,5 points

- A) Le NH<sub>4</sub>Cl induit l'acidification des endosomes (cf TD1, expérience 3). S'il est ajouté au milieu de culture entre -10 et 3 min post exposition au virus, un faible nombre de cellules est infecté. (1 pt). Cela veut dire que le virus n'est pas encore rentré dans la cellule. L'ajout du NH<sub>4</sub>Cl entre 4 et 9 minutes post-infection, induit une augmentation du nombre de cellules infectées. Après 9 minutes, l'effet est perdu (car l'étape de fusion s'est déjà déroulée) (1 pt).  
Bravo à qui a fait remarquer qu'il manque un contrôle dans cette expérience !
- B) Le pourcentage de cellules fusionnées augmente lorsque le pH du milieu est ~ 6.2 ou inférieur. (1 pt)

Ces résultats montrent que l'entrée du DV met en jeu une étape de fusion membranaire dans les endosomes précoces. **(1 pt)**

Question 10 : A l'aide d'un schéma, rédigez en forme synthétique les informations apprises avec les analyses des Figures 1 à 4. *4 points*

Schémas virus enveloppé avec génome ARN et spicule à la surface **(1 pt)**

Interaction spicule avec le récepteur (Axl, TIM-1) localisé à la membrane plasmique de la cellule cible **(1 pt)**

Endocytose de la particule virale **(1 pt)**

Fusion enveloppe viral avec membrane de l'endosome après acidification **(1 pt)**