



**HAL**  
open science

## Validation d'interactions moléculaires candidates entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule-hôte bovine

Manon Borde, Eve Laloy, Quentin Richard, Naomi Ledey, Grégory Caignard, Anthony Relmy, Aurore Romey, Kamila Gorna, Damien Vitour, Stéphan Zientara, et al.

### ► To cite this version:

Manon Borde, Eve Laloy, Quentin Richard, Naomi Ledey, Grégory Caignard, et al.. Validation d'interactions moléculaires candidates entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule-hôte bovine. XXèmes Journées Francophones de Virologie, Mar 2018, Paris, France. anses-04440768

**HAL Id: anses-04440768**

**<https://anses.hal.science/anses-04440768>**

Submitted on 6 Feb 2024

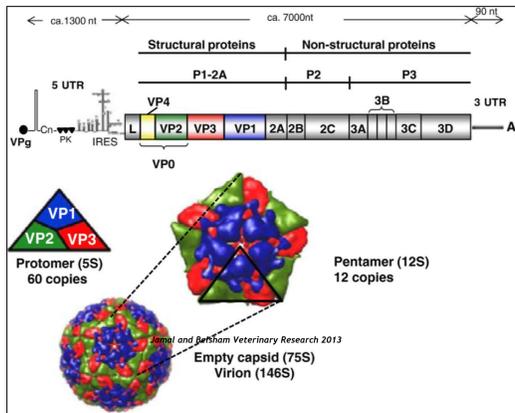
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## INTRODUCTION

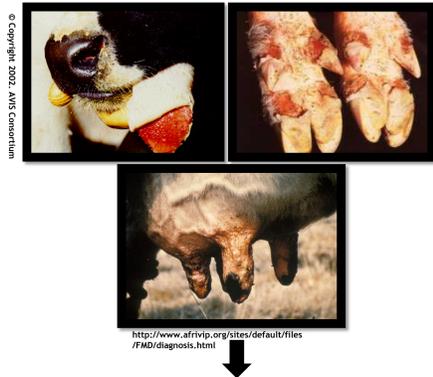
La fièvre aphteuse (FA) est une maladie animale virale très contagieuse affectant les artiodactyles domestiques et sauvages (principalement bovins, porcins, ovins et caprins). Le virus responsable est le FMDV (Foot-and-Mouth Disease Virus).

### Le FMDV



Picornavirus du genre *Aphtovirus*, génome à ARN simple brin de polarité positive, importante variabilité génétique et antigénique, 7 sérotypes décrits (O, A, C, South African Territories=SAT1, SAT2, SAT3 et Asia1)

### Signes cliniques de la FA



- Hyperthermie,
- Lésions nasales, buccales, podales et mammaires : vésicules ou « aphtes »

### Conséquences socio-économiques

En 2001, UK :	France
2036 foyers	2 foyers
6.5 M d'animaux abattus	58 000 animaux abattus
3.1 milliards de £ (Agr.)	1 semaine d'embargo :
3.6 milliards de £ (tourisme)	40 millions €

\*Anderson 2002



La FA reste une menace importante et actuelle. Son impact socio-économique en cas d'épizootie est considérable

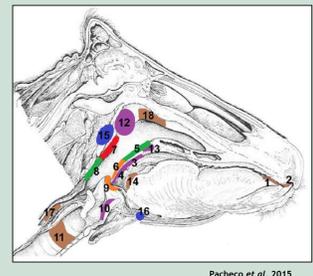
### Persistance virale = obstacle au contrôle de la FA

#### Définition de la persistance du FMDV

- FMDV infectieux isolé 28 jours p.i.
- 15-50% des ruminants peuvent être infectés de manière persistante
- Durée de la persistance : ex : jusqu'à 3.5 ans chez les bovins

#### Sites anatomiques de persistance du FMDV

- Epithélium du nasopharynx dorsal,
- Epithélium du palais mou dorsal
- Centres germinatifs des tissus lymphoïdes, amygdales palatines (notamment chez buffles Afr.)



Comment les interactions FMDV/cellule-hôte bovine contribuent-elles à l'établissement et au maintien de la persistance ? Quels sont les déterminants viraux et cellulaires impliqués ?

### RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

- 11 interactions protéine virale/protéine cellulaire bovine identifiées au laboratoire par crible double hybride
- 3 voies de signalisation impliquant potentiellement (immunité innée, apoptose et autophagie)
- Des mutations virales associées à la persistance du virus en modèle de cellules épithéliales bovines primaires de palais mou dorsal

### OBJECTIFS

- Validation biochimique des interactions candidates par chromatographie d'affinité ou « GST pull down »
- Construction d'un clone infectieux ADNc du FMDV de type O pour disposer d'un système de génétique inverse permettant d'étudier l'impact des mutations virales associées à la persistance sur les interactions virus/cellule bovine

## MATÉRIELS & MÉTHODES

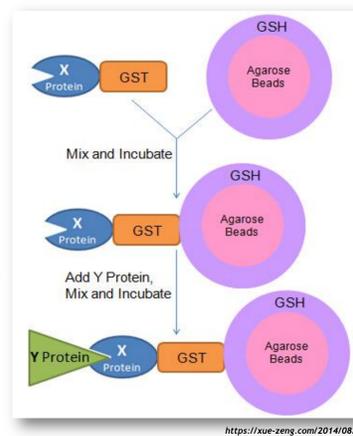
### 1. Surexpression des appâts viraux et proies cellulaires en cellules HEK293T

**J-1** Cellules HEK293T cultivées en DMEM + 10% SVF + 1% Penicilline-streptomycine → 2x10<sup>6</sup> cellules/puits

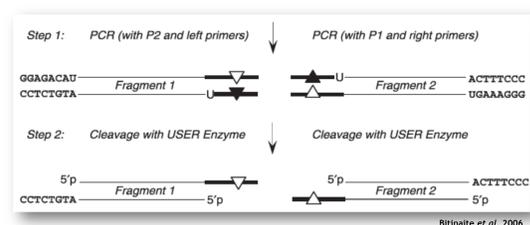
**J0** Transfection des cellules (jetprime, polyplus) Incubation 36 h à 37° C. 500ng appât viral (tag GST) 500ng proie cellulaire (tag 3X Flag) 4µL de JETPRIME

### **J+2** GST pull down

1. La protéine appât virale fusionnée à une étiquette GST → capturée sur des billes de GSH
2. Le complexe formé (protéine virale/protéine cellulaire) est séparé du reste des protéines solubles par lavages et centrifugation
3. Analyse par électrophorèse SDS PAGE et Western blot



### 2. Clone infectieux du FMDV type O

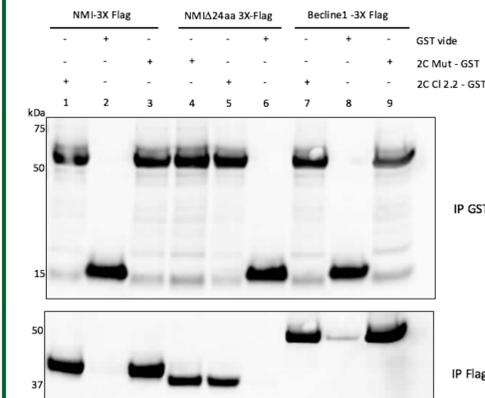


#### Technique USER fusion

1. Dessin d'amorces uracilées pour générer des fragments de 1500 à 2000 pb → Synthèse des fragments d'ADNc par PCR
2. Traitement à l'Uracile N-glycosylase
3. Ligation thermostable par la PFU ligase → purification
4. Ligation finale par ligase T4 (ADN)
5. Transcription *in vitro*
6. Transfection cellulaire pour générer le virus recombinant

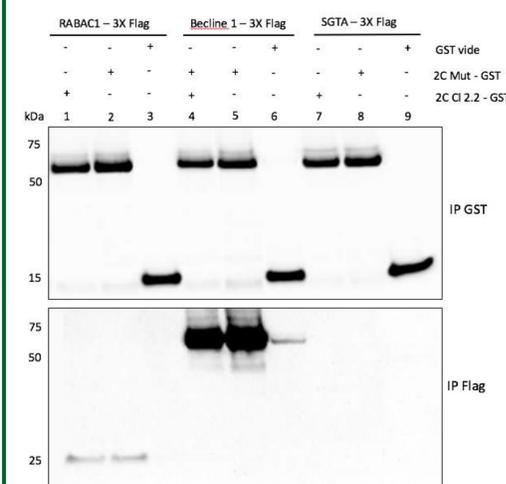
## RÉSULTATS

### 1. Validation des interactions identifiées pour la protéine 2C



#### Les protéines cellulaires identifiées initialement à l'issue du crible

- NMI interagit avec STAT → augmentation de la réponse IL-2 et IFN-I
- NMIΔ24 : forme tronquée de NMI
- RABAC1 ou PRA1 (Prelylated Rab acceptor protein 1) : protéine régulant le trafic vésiculaire du Golgi ; connue pour interagir avec une protéine oncogène du Virus d'Epstein-Barr, → augmentation de la réponse IFN-I
- SGTA : Heat shock protein dont la fonction reste inconnue
- Beclin-1 : protéine impliquée dans l'autophagie ; décrite dans la littérature pour interagir avec la protéine 2C du FMDV



#### Validation des interactions appâts viraux / proies cellulaires

- NMI, NMIΔ24 et RABAC1 interagissent chacune avec la 2C sauvage et la 2C mutée
- Pas de validation biochimique de l'interaction de SGTA avec la 2C sauvage et la 2C mutée
- Beclin-1 sert de contrôle positif lors des Western blot

### 2. Clone infectieux du FMDV type O

- En cours : Dessin des 5 couples d'amorces uracilées
- Prochaine étape : optimisation du protocole de USER fusion

## CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

- 2 interactions 2C/protéine cellulaire bovine validées biochimiquement, 1 non validée : validation fonctionnelle et co-localisation cellulaire à suivre
- Poursuite de la validation biochimique des interactions candidates identifiées pour la protéine 3D
- Validations biochimiques et fonctionnelles à prévoir dans les cellules bovines d'intérêt : mise au point du protocole de transfection des cellules du palais mou dorsal en cours
- Caractérisation du virus recombinant obtenu par génétique inverse

Les résultats obtenus devraient nous permettre de mieux comprendre la pathogenèse du FMDV par l'identification des voies de signalisation cellulaires modulées au cours de l'infection (aiguë ou persistante) et pourraient donc contribuer au développement de meilleures stratégies de contrôle.