

[COVID Information Commons \(CIC\) Research Lightning Talk](#)

[Transcript of a Presentation by Ruth Serra-Moreno \(University of Rochester\), May 19, 2021](#)



Title: [Dynamique de remodelage membranaire par le SRAS-CoV-2](#)

[Ruth Serra-Moreno CIC Profile](#)

NSF Award #: [2032518](#)

[YouTube Recording with Slides](#)

[May 2021 CIC Webinar Information](#)

Transcript Editor: Macy Moujabber

---

Transcript

*Slide 1*

Tout d'abord, je tiens à vous remercier tous de nous avoir invités à participer aux conférences éclair.

*Slide 2*

Je ne pense pas que ce virus ait besoin d'être présenté. Je souhaite simplement attirer votre attention sur la simplicité de cet agent infectieux. Il se compose uniquement d'une enveloppe ou d'une bicouche lipidique dans laquelle sont intégrées plusieurs glycoprotéines, dont la S ou spike qui se lie au récepteur ACE2 des cellules épithéliales des voies respiratoires humaines et qui permet au virus de pénétrer dans les cellules. Sous cette enveloppe se trouve une nucléocapside constituée d'un seul brin d'ARN d'environ 30 kilobases de long. C'est le génome du virus et il est enveloppé dans la protéine N ou acide nucléaire.

*Slide 3*

À l'instar des autres coronavirus qui infectent les humains, le SRAS-CoV-2 est le résultat d'un débordement d'un coronavirus infectant les chauves-souris qui a été transmis à un hôte intermédiaire, puis à la population humaine.

*Slide 4*

L'exposition à des virus qui infectent d'autres espèces est fréquente. Cependant, dans la plupart des cas, les interactions aboutissent à des impasses. Dans quelques cas, cependant, ces interactions peuvent déboucher sur une infection productive en raison de l'échec de la barrière de l'espèce contenant le pathogène. Si, en raison de la croissance de la population humaine, il y a un chevauchement avec l'habitat de l'hôte naturel, cela augmente la probabilité de futurs événements d'exposition potentiels qui peuvent ouvrir la voie à une adaptation où le virus peut accumuler des mutations, subir des événements

de recombinaison et, enfin, la sélection naturelle s'opère. Une indication de cette adaptation est la présence d'une transmission interhumaine où l'interaction avec l'hôte direct n'est plus nécessaire.

#### *Slide 5*

Ainsi, depuis le début du siècle, trois coronavirus hautement pathogènes sont apparus dans la population humaine : le coronavirus original du SRAS, le coronavirus MERS et le coronavirus du SRAS 2. Ils sont tous le résultat d'événements de débordement de coronavirus bêta infectant des chauves-souris, qui ont été transmis à d'autres mammifères avant d'atteindre l'homme. Ces infections se caractérisent par une transmission interhumaine assez rapide, ce qui indique que ces virus trouvent un environnement cellulaire idéal pour se répliquer dans l'hôte naturel, l'hôte intermédiaire et l'hôte final.

#### *Slide 6*

Nous émettons l'hypothèse que l'autophagie est l'un des processus utilisés par le coronavirus pour se répliquer, car l'autophagie est très conservée chez les mammifères.

#### *Slide 7*

L'autophagie consiste donc en la formation de vésicules à double membrane, également appelées autophagosomes, pour la collecte de cargaisons telles que des protéines mal repliées ou des organites défectueux qui doivent être acheminés vers le lysosome pour y être éliminés. Si nous examinons ce schéma du cycle de vie des coronavirus, nous constatons qu'une particularité de ces infections est le remodelage actif des membranes cellulaires pour générer des vésicules à double membrane ou DMV qui fonctionnent comme des usines de réplication virale. C'est là que se produit la réplication du génome des coronavirus. La structure de ces DMV ressemble beaucoup à celle des autophagosomes. C'est pourquoi nous émettons l'hypothèse que les coronavirus, et en particulier le SARS-CoV-2, pourraient détourner la machinerie de l'autophagie comme source de ces vésicules à double membrane.

#### *Slide 8*

Ce projet RAPID de la NSF comporte donc deux objectifs différents. Pour gagner du temps, je ne parlerai que de l'objectif 2, qui concerne l'interaction entre l'autophagie et les coronavirus.

#### *Slide 9*

Pour ces expériences, nous créons un ensemble de lignées cellulaires qui expriment un marqueur de l'autophagie, LC3, fusionné avec la GFP, afin de pouvoir surveiller la formation d'autophagosomes dans le flux d'autophagie. Les lignées cellulaires que nous développons sont la cellule Vero E6, qui est une lignée cellulaire prototype pour la recherche sur les coronavirus. L'ACE2 est exprimée dans les cellules pulmonaires de furet, les cellules pulmonaires de chauve-souris et l'ACE2 est exprimée dans les cellules pulmonaires humaines, en particulier les cellules A549.

### *Slide 10*

En plus de ces cellules, nous avons également acquis une bibliothèque des différents cadres de lecture ouverts codés dans le génome du coronavirus du SRAS afin de pouvoir évaluer comment l'expression individuelle de ces gènes affecte la formation d'autophagosomes et le flux d'autophagie. Et nous avons pu voir quelques candidats, comme les cadres de lecture ouverts 3a, 7a, la protéine structurale M, et les protéines non structurales 6 et 14. C'était très intéressant, car cela indique que ces protéines sont déclenchées dans l'autophagie. Toutefois, nous devons prendre ces informations avec prudence car ces expériences ont été réalisées dans des conditions de transfection en l'absence du reste du génome du SRAS-CoV-2 qui peut également contribuer à moduler l'expression de ces protéines.

### *Slide 11*

L'étape suivante consiste donc à réconcilier ces informations dans le contexte d'une infection. Pendant que nous attendions l'autorisation pour le niveau de sécurité biologique 3 et que nous recevions l'EPI, l'équipement de protection individuelle, nous avons effectué certains de ces essais avec un autre coronavirus, un coronavirus de niveau de sécurité biologique 2 qui infecte les humains OC43 et qui affecte également les voies respiratoires.

### *Slide 12*

La première chose que nous avons faite a été d'évaluer à quel moment après l'infection nous détectons déjà la réplication du génome parce qu'à ce moment-là, le remodelage des membranes solaires doit déjà avoir eu lieu. Nous constatons une augmentation exponentielle du nombre de copies d'ARN génomique accumulées entre quatre et huit heures après l'infection. Ceci est cohérent avec le fait que nous détectons déjà les particules [nouveau virion ?] huit heures après l'infection.

### *Slide 13*

Nous avons ensuite infecté nos cellules d'ingénierie avec OC43 à une multiplicité d'infection de un, ce qui signifie que chaque cellule reçoit une particule virale. Nous avons ensuite procédé à une imagerie en direct time-lapse pendant huit heures pour voir s'il y avait des fluctuations dans la formation des autophagosomes.

### *Slide 14*

Voici quelques images représentatives de cette étude dans laquelle nous avons eu trois conditions expérimentales différentes. Dans la première, les cellules ont été traitées avec de la rapamycine dans la partie supérieure. La rapamycine est un médicament qui déclenche l'autophagie et ces cellules nous permettent de l'utiliser comme contrôle positif, les cellules traitées à l'identique au milieu, et enfin, en bas, les cellules infectées par l'OC43. La première chose que je veux que vous voyiez, c'est qu'au temps zéro, sans exposition, sans stimulus, nous détectons déjà tous les autophagosomes qui sont représentés par ces [pante ?], ces points brillants. C'est normal et attendu. L'autophagie est très importante pour l'homéostasie solaire et il y aura toujours un certain degré d'activation de l'autophagie - les cellules STEM encore plus que les autres. La prochaine chose que je voudrais que vous remarquiez est que deux heures après avoir stimulé les cellules avec la rapamycine, nous voyons une augmentation significative

de la formation de milliers de cellules, même dans la cellule qui avait déjà beaucoup d'autophagie en cours, mais encore plus dans l'autre cellule que nous avons à peine vue dans l'image précédente. Au fil du temps, ces autophagosomes augmentent non seulement en nombre mais aussi en taille. Ils augmentent en taille et huit heures après le traitement, nous commençons à observer une diminution du nombre d'autophagosomes, ce qui indique que la résolution de cette voie de fusion avec les lysosomes entraînera l'élimination de ces structures. Dans les cellules traitées de façon simulée, nous ne voyons pas beaucoup de fluctuations dans le nombre d'autophagosomes au fil du temps. Dans les cellules infectées par l'OC43, nous observons une augmentation du nombre d'autophagosomes, en particulier six heures après l'infection, mais contrairement aux cellules traitées par la rapamycine, nous n'observons pas d'augmentation du nombre d'autophagosomes, qui semble rester plus stable.

#### *Slide 15*

Voici donc les quantifications de l'étude cinétique pour toutes les cellules que nous avons imagées et nous quantifions une fois de plus les cellules traitées par simulacre : pas de grande fluctuation dans le temps, les cellules traitées par la rapamycine : forte augmentation des autophagosomes, plateau, puis résolution, et les cellules infectées par l'OC43 : nous voyons une augmentation de la formation d'autophagosomes, pas autant qu'avec la rapamycine, mais nous ne voyons pas l'élargissement des autophagosomes et la résolution de cette voie. C'est encourageant. Cela pourrait indiquer que ce coronavirus particulier profite d'une manière ou d'une autre de la machinerie de l'autophagie, mais cela pourrait aussi être interprété différemment. Nous savons que l'autophagie n'est pas seulement importante pour l'homéostasie cellulaire, c'est aussi un mécanisme de défense antivirale très important. À ce stade, nous ne savons donc pas si cette augmentation des autophagosomes est induite par le virus ou si la cellule réagit à l'infection.

#### *Slide 16*

L'un des moyens de répondre à cette question, et je m'excuse parce que ces expériences sont en cours cette semaine et que je n'ai pas encore les données, est de voir si la machinerie de réplication du virus se colocalise avec ces structures autophagiques. D'une part, la réplication - l'ARN polymérase ARN dépendante - mais aussi les produits de la réplication du génome, les nouvelles copies de l'ARN génomique, les biproduits de la réplication comme l'ARN double brin. La prochaine chose à faire est de répéter ces expériences avec le SARS-CoV-2. Nous avons maintenant l'autorisation de biosécurité. Nous avons le stock de virus et nous sommes donc prêts à partir. Une question à laquelle nous souhaitons vivement répondre est de savoir si nous observons des différences entre les différentes variantes du SRAS-CoV-2, en particulier celles qui sont hautement transmissibles comme la variante britannique et la variante sud-africaine. Restez donc à l'écoute. Je vous tiendrai au courant.

Sur ce, je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué à ce travail, en particulier mon étudiante diplômée Yuexuan Chen. C'est une étudiante brillante, super motivée et très enthousiaste. Elle est le véritable chef de file de ce projet et c'est un privilège de l'avoir dans le laboratoire, je ne pourrais pas être plus heureux. Le reste de l'équipe, Yuhang, Sydney, Jared et Sergio, qui a récemment déménagé pour obtenir une bourse postdoctorale en Suède, et bien sûr la NSF pour son financement et son soutien. Merci. Je serai ravie de répondre aux questions posées dans le chat.