



**HAL**  
open science

# Mise en évidence de l'entrée cellulaire du virus Nipah par macropinocytose : bases moléculaires et inhibition

Olivier Pernet

► **To cite this version:**

Olivier Pernet. Mise en évidence de l'entrée cellulaire du virus Nipah par macropinocytose : bases moléculaires et inhibition. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2009. Français. NNT : . tel-00448339

**HAL Id: tel-00448339**

**<https://theses.hal.science/tel-00448339>**

Submitted on 18 Jan 2010

**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.

N° d'ordre : 548

N° attribué par la bibliothèque : \_\_ENSL548

# THESE

en vue d'obtenir le grade de

***Docteur de l'École Normale Supérieure de Lyon – Université de Lyon***

*spécialité : Sciences de la Vie*

***École Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrée et Cellulaire***

## **Mise en évidence de l'entrée cellulaire du virus Nipah par macropinocytose : bases moléculaires et inhibition**

*présentée et soutenue publiquement le 9 décembre 2009*

***par Monsieur Olivier Pernet***

*Après avis de :* Pr Winfried Wiessenhorn  
Dr Michel Pépin

*Devant la commission d'examen formée de:*

Dr Pierre Jurdic - Président  
Pr Winfried Wiessenhorn – Rapporteur  
Dr Michel Pépin - Rapporteur  
Dr Noël Tordo – Examineur  
Dr Robin Buckland – Directeur de thèse

Thèse préparée à l'Inserm U758  
Équipe Buckland : Paramyxovirus entry  
21, avenue Tony Garnier  
69365 – Lyon Cedex 07  
FRANCE  
  
(2006-2009)

*Couverture : Image 3D de deux cellules CHO exprimant ephrinB2-eGFP et dont l'ADN a été marqué au DRAQ5 (en bleu). Elles présentent les longs prolongements membranaires induits ephrinB2 : les filopodes. (Photos et reconstruction 3D : Olivier Pernet, 26 Novembre 2007)*

## **Mise en évidence de l'entrée cellulaire du virus Nipah par macropinocytose : bases moléculaires et inhibition**

### Résumé

Les virus Nipah et Hendra sont deux Paramyxovirus émergents zoonotique apparus ces 15 dernières années en Asie du Sud-Est et en Australie. Ils sont responsables chez l'homme d'encéphalites dont le taux de mortalité peut dépasser les 90%. Il n'existe ni traitements, ni vaccins commercialisés. Ces virus sont donc classés P4. En étudiant la régulation négative de leur récepteur éphrineB2, j'ai pu mettre en évidence un mécanisme d'entrée endocytique pour le virus Nipah : la macropinocytose. Les Henipavirus sont les seuls Paramyxovirus connus dont on a pu démontré un tel mode d'entrée. En mimant le ligand naturel d'éphrineB2 (EphB4), les glycoprotéines virales G provoquent la rétractation des filopodes qui forment autour du virus des macropinosomes. De plus, l'entrée de ces virus peut-être bloquée *in vitro* par des inhibiteurs de macropinocytose. Certains de ces inhibiteurs sont déjà utilisés en médecine humaine, ce qui ouvre la voie à un traitement peu onéreux contre ces dangereux pathogènes.

*Mots clefs : Nipah virus ; Hendra virus ; Macropinocytose ; Entrée virale ; Chauves-souris ; éphrineB2 ; antiviraux*

## **Demonstration that Nipah virus entry occurs by macropinocytosis : molecular basis and inhibition**

### Abstract

Nipah and Hendra are two zoonotic Paramyxoviruses that have emerged over the last 15 years in South-Eastern Asia and Australia. They are responsible for encephalitis in man with a mortality rate that can exceed 90%. As there are no treatments nor vaccines available these viruses are classified P4 pathogens. By studying the receptor ephrinB2's downregulation, I discovered that Nipah virus uses an endocytic mechanism for entry : the macropinocytosis. The Henipavirus are the only known Paramyxoviruses that use such an entry mechanism. By mimicking the ephrinB2's ligand (EphB4), the viral glycoprotein G causes the retraction of filopodia to engulf the virus and form macropinosomes. I have demonstrated that the entry of these viruses can be blocked *in vitro* by the use of drugs that inhibit macropinocytosis. As some of these inhibitors are already used in human medicine, this could pave the way for a low-cost treatment of these dangerous pathogens to be developed.

*Key words : Nipah virus ; Hendra virus ; Macropinocytosis ; virus entry ; Bats ; ephrinB2 ; antivirals*

## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN(m) : acide ribonucléique (messenger)  
SARS : SRAS, syndrome respiratoire aigu, sévère  
NiV : virus Nipah  
HeV : virus Hendra  
MeV : Measles virus (virus de la rougeole)  
CDC : *Center for diseases control* (Centre Américain de contrôle des maladies)  
CDV : *Canine Disptemper virus* (virus de la maladie de Carré)  
NDV : virus de la maladie de Newcastle  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
DC : cellule dendritique  
LD50 : dose létale 50%  
Pfu : particules formant une unité infectieuse  
IL : interleukine  
CD : *Cluster of differenciation*  
PCR : *Polymerase chain reaction* (Réaction en chaine de polymérase)  
RT-PCR : *Reverse Transcriptase PCR* (PCR par transcriptase inverse)  
CHO : *Chinese Hamster Oviarian cells* (cellules d'ovaire de hamster chinois)  
Vero : Vervet Origine, cellules de rein de vervet  
BHK : *Baby Hamster Kidney Cell* (cellule de rein de hamster)  
HeLa : Henrietta Lacks cells - Cellule de cancer du col  
PDB : *Protein Data Bank* (Banque de donnée sur les protéines)  
kDa : kilo Dalton  
nt : Nucléotide  
VLPs : *virus Like Particles* (Simili-Particules Virales)  
Fc : Fragment constant des immunoglobulines  
eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein (Protéine Verte Fluorescente améliorée)

## Remerciements

J'aimerais remercier tout d'abord mon Directeur de Thèse, Dr Robin Buckland, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et formé tout au long ces quatre dernières années. Je ne saurais trop le remercier de m'avoir laissé une si grande indépendance et d'avoir soutenu mes choix, ce qui a permis les nombreuses variations autour du projet initial.

Je remercie Dr. Pierre Jurdic d'avoir accepté de présider mon jury. Je remercie aussi Pr. Winfried Weissenhorn et Dr. Michel Pépin d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie Dr. Noël Tordo d'avoir accepté d'être examinateur et d'avoir suivi avec intérêt mes travaux ces quatre dernières années.

Je remercie le jury 2005/2006 de l'Ecole Doctorale BMIC d'avoir cru en ce projet de m'avoir confié une bourse du Ministère de l'Enseignement Nationale, de la Recherche et des Technologies.

Je remercie Dr. Hervé Raoul et Dr. Marie Claude Georges-Courbot de m'avoir permis de travailler au laboratoire P4 Jean Mérieux. Je remercie Sandra Lacote de m'avoir formé au travail en scaphandre et d'avoir porté le projet concernant la vidéo-microscopie au P4. Je remercie Christophe Bertauld, Dr. Christophe Leculier et toute l'équipe de la biosécurité ainsi que le Poste Central de Sécurité pour m'avoir permis de travailler dans les conditions optimales de sécurité. Je remercie tout ceux avec j'ai partagé les joies de l'air en bouteille : Dr. Christophe Peyrefitte, Dr. Sébastien Delpeut, Olivier Reynard, Mathieu Matteo, Audrey Page, et tous les autres ...

Je remercie toute l'équipe du PLATIM pour avoir mis à ma disposition les équipements dont j'avais besoin et de m'avoir formé à leur utilisation. Je remercie Viktor Volchkov et Valentina Volchkova pour leurs virus recombinant. Je remercie la Société Française d'Etude et de Protection des Mammifères et le Syndicat Mixte des Gorges du Gardon qui m'ont permis d'étudier les chauves-souris sur le terrain. Je remercie particulièrement Guy Derivaz qui m'a fait découvrir les grottes des Gorges du Gardon et leurs *habitantes*.

Je remercie les enseignants et les chercheurs qui m'ont aidé, poussé et motivé tout au long de ma scolarité. Parmi eux, les Docteurs Nathalie Dejuçq-Rainsford et Christophe Staub, Christiane Guguen-Guillouzo et Jacques LeSeyec, Yahia Chebloune, Gláucia Paranhos-Baccalà et Florence Komurian-Pradel ainsi que Stéphane Pouzol m'ont accompagné et formé tout au long de mon parcours pré-doctoral. J'aimerais remercier particulièrement Pr. Louis Gazzolo et Dr. Madeleine Duc-Dodon qui m'ont apporté énormément. Je remercie par la même occasion leurs étudiants et notamment Dr. Mélanie Wencker, Dr. Amélie Sabine, Camille Levy, Anne-Sophie Kuhlmann et Julien Villaudy qui m'ont accompagné ces cinq dernières années.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont pu m'aider et me soutenir au laboratoire : Dr. Vanessa Guillaume, Ghina Haffar, Celine Garcia, Anne Ruiz, Joséphine Reynaud, Fahren Cyprian, Cyrille Mathieu, Dr. Yohan Druelle et Dr. Hasan Kweder. Je remercie Michelle Ainouze d'être la meilleure technicienne que j'ai rencontrée. Je remercie Dr. Séverine Devergnas de m'avoir poussé vers la microscopie confocale. Je remercie Dr. Christine Pohl pour son énorme travail aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur du P4, ainsi que pour son zèle et son perfectionnisme. Je remercie chaleureusement Dr. Hamide Aslan pour son aide et son amitié.

Enfin, je remercie mes amis et ma famille qui m'ont soutenu du début jusqu'à la fin.



## **TABLE DES MATIERES**



INTRODUCTION GENERALE.....	13
CHAPITRE PREMIER :.....	17
RAPPORT BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
I-Introduction.....	18
I-1-Les virus émergents et les zoonoses.....	18
I-2-Quelques exemples de virus émergents.....	19
Le VIH : virus émergent par excellence.....	19
Les animaux domestiques et les zoonoses.....	19
Les Filoviridae.....	21
II-Les Henipavirus.....	22
II-1-L'émergence du virus Hendra.....	22
II-2-L'émergence du virus Nipah.....	26
La souche Malaisienne.....	26
La souche Bangladeshie.....	28
II-3-Comparaison entre Nipah et Hendra.....	32
Réservoirs et Hôtes intermédiaires.....	32
Structure.....	32
Pathologie.....	32
II-4-Les Henipavirus dans le monde.....	33
Asie du Sud Est.....	34
Afrique de l'Est : Madagascar.....	35
Afrique de l'Ouest : Ghana.....	35
II-5-Les réservoirs du virus.....	37
Les Roussettes Océaniques.....	37
Les Roussettes Africaines.....	37
Les Microchiroptera.....	38
III-Phylogénie et virus apparentés.....	41
III-1-Généralités concernant les Paramyxovirus.....	41
III-2-Les Morbillivirus.....	42
Le virus de la rougeole.....	42
La maladie de Carré.....	46
IV-Biologie Moléculaire des Henipavirus.....	47
IV-1-Structure génétique et séquences codantes des Henipavirus.....	47
Taille du génome.....	47
Mécanisme répliquatif.....	48
IV-2-Les gènes des Henipavirus.....	49
.....	49
V-Les protéines virales et leurs rôles dans le cycle viral.....	50
V-1-Le complexe ribo-nucléoprotéique.....	50

V-2-Les protéines non structurales des Henipavirus.....	53
V-3-La protéine de matrice M.....	54
V-4-La glycoprotéine de fusion F .....	55
Généralités concernant la glycoprotéine F.....	55
La chloroquine, inhibiteur de la maturation de F.....	58
V-5-La glycoprotéine d'attachement G.....	62
VI-Le récepteur cellulaire des Hénipavirus : l'éphrineB2 .....	64
VI-1-Généralités.....	64
VI-2-Le rôle de l'éphrineB2 dans l'angiogénèse.....	65
Fonction de l'éphrineB2.....	65
Exemple des interactions entre éphrineB2 et EphB4.....	67
VI-3-Le rôle de l'éphrineB2 dans la neurogénèse.....	67
VI-4-Autres rôles de l'éphrineB2 : systèmes immunitaire, osseux.....	68
VII-L'entrée et la dispersion des Henipavirus dans l'organisme.....	69
VII-1-L'entrée.....	69
VII-2-Dispersion.....	70
VIII-Diagnostic et Traitements.....	71
VIII-1-Diagnostic.....	71
Diagnostic en Imagerie par Résonance Magnétique .....	71
Diagnostic sérologique et biologie moléculaire.....	72
VIII-2-Les tentatives de traitements thérapeutiques.....	72
VIII-3-Vaccination anti-Nipah.....	75
VIII-4-Protéger les hommes en protégeant les chauves-souris?.....	75
IX-Mécanismes moléculaires d'entrée cellulaire des virus.....	78
IX-1-La fusion des membranes virales et cellulaires.....	78
Les protéines de fusion de classe I.....	78
Les protéines de fusion de classe II.....	80
Les protéines de fusion de classe III.....	80
IX-2-La fusion virale : à la surface ou dans les endosomes.....	80
X-Mécanisme moléculaire d'entrée des Henipavirus (hypothèse actuelle).....	81
X-1-L'interaction entre la glycoprotéine G et l'éphrineB2.....	81
X-2-L'interaction entre G et F, pré-requis pour la fusion.....	83
X-3-Entrée cellulaire des Paramyxovirus : deux cas d'exception.....	84
XI-Macropinocytose.....	85
XI-1-Les voies endocytiques : des voies détournée par les pathogènes.....	85
XI-2-Définition et rôles de la macropinocytose .....	87
XI-3-Le déroulement de la macropinocytose.....	87
XI-4Mécanismes moléculaires et inhibiteurs de la macropinocytose .....	88
XI-5-Détournement de la macropinocytose par les pathogènes.....	91
Bactéries.....	91
Virus.....	92
CHAPITRE SECOND.....	94
RESULTATS.....	94
I-Étudier l'entrée cellulaire des Henipavirus : besoin de nouveaux outils.....	95
I-1-Problématique.....	95
I-2-L'éphrineB2-Myc.....	96
I-3-L'éphrineB2-eGFP.....	98
II-L'éphrineB2 est internalisée en présence de NiV-G.....	101
II-1-Observations.....	101
II-2-Co-endocytose de l'éphrineB2 et de la glycoprotéine G lors de contact par cellules	

opposantes.....	102
II-3-Localisation de la dégradation du complexe éphrineB2–glycoprotéine G.....	102
III-Un mécanisme d'entrée endocytaire pour le virus Nipah.....	106
III-1-Observations.....	106
III-2-La glycoprotéine G mime la protéine EphB4.....	106
Étude de l'interaction entre les domaines extra-cellulaires d'éphrineB2 et de la glycoprotéine G.....	106
Conséquence de l'attachement de la glycoprotéine G sur la queue cytoplasmique d'éphrineB2.....	108
III-3-Le signal émis par l'éphrineB2 suivant l'attachement de la glycoprotéine G et son inhibition.....	109
Effet de la génistéine sur l'entrée du virus Nipah.....	109
Rôle dans l'entrée du virus Nipah des PI3Ks et leurs inhibitions.....	112
Les mouvements membranaires liés au signal d'activation .....	112
Effet de la Toxine B sur l'entrée du virus Nipah.....	113
Effets des inhibiteurs du cytosquelette sur l'entrée du virus.....	113
Le mécanisme endocytaire d'entrée utilisé par le virus Nipah est la macropinocytose .....	114
IV-Les inhibiteurs des infections hénipavirales.....	117
IV-1-Inhibition de l'entrée du virus Nipah in vitro.....	117
Réflexion générale.....	117
L'amiloride.....	117
La chloroquine.....	118
IV-2-Inhibition de l'entrée du virus in vivo : le hamster doré comme modèle animal.....	120
Traitements.....	120
Effets de la chloroquine et de l'amiloride in vivo.....	121
V-Rôle de la queue cytoplasmique de la glycoprotéine G dans l'entrée et la dispersion du virus Nipah.....	121
V-1-Hypothèse de travail.....	121
V-2-Effets des mutations de la queue cytoplasmique sur l'entrée des virus recombinants .....	122
VI-Identification du domaine d'interaction de F avec G.....	125
VI-1-Hypothèse de travail.....	125
VI-2-Effet des mutations dans le domaine riche en cystéines de la glycoprotéine F sur l'interactions avec la glycoprotéines G.....	126
Résultats des tests de fusion.....	126
Résultats des expériences de co-immunoprécipitation.....	126
VII-Rôle de la conformation de la tige de l'éphrineB2 dans l'infection par les Henipavirus .....	128
VII-1-Hypothèse de travail.....	128
VII-2-Effet potentiel de l'angle de la tige sur l'entrée du virus.....	130
VIII- Dépistage des Hénipavirus chez les chauves-souris du Sud de la France.....	131
VIII-1-Le cas des chauves-souris européennes.....	131
Introduction.....	131
Prélèvements.....	131
Extraction des virus et infections : .....	134
VIII-2-Résultats.....	134
PERSPECTIVES.....	135
Études des récepteurs viraux par test d'internalisation.....	136
Cancer, éphrineB2 et le virus Nipah.....	137

DISCUSSION ET CONCLUSION.....	139
REFERENCES.....	143
ANNEXE.....	155
I-Meeting Reports.....	156
Nipah virus Colloquium, Kuala Lumpur 2008.....	156
II-2-International Meeting on Emerging Diseases – Vienna 2009 (Science).....	158
II-Article.....	159
.....	172
ANNEXE 2.....	173
(Materiels et Methodes Supplementaire) .....	173
Visualisation de l'entrée du virus Nipah par macropinocytose.....	174
VLPs de NiV.....	174
Coloration des virus et analyse en Time-Lapse.....	174
Observation des particules virales par fluorescence.....	174
J1 : Préparation de cellules Vero et CHO. ....	175
J2 : Préparation des virus.....	175
J3 : Préparation des cellules.....	175
J4 : Coloration et observations.....	176



## **INTRODUCTION GENERALE**

Les virus sont des parasites obligatoires qui peuvent être pathogènes, voire mortels pour leur hôte. Chaque année, de nouveaux virus sont découverts : certains inoffensifs, certains mortels. La plupart ont pour origine la cohabitation entre humains et animaux. Ce sont les zoonoses émergentes et peuvent rapidement devenir des problèmes de santé publique majeurs. Les plus célèbres sont sans doute le VIH et ses 60 millions de personnes infectées, ou le virus Ebola dont les fièvres hémorragiques ont inspiré les auteurs littéraires et cinématographiques, ou encore le coronavirus du SARS et les très médiatiques virus de grippe.

Parmi ces virus émergents, deux sont apparus dans les années 90 et sont très étroitement liés : les virus Nipah et Hendra. Ces deux virus viennent des chauves-souris frugivores, chez qui ils ne semblent pas ou peu dangereux. Longtemps isolés dans les forêts équatoriales, ces chauves-souris se sont rapprochées des humains lors de la destruction ou de la perturbation de ces forêts. Affaiblies, elles sont devenues contagieuses et ont d'abord contaminé des animaux tels que les chevaux et les porcs qui ont amplifié le virus et contaminé les humains.

Les épidémies en Australie et plus encore en Malaisie ont provoqué de graves encéphalites chez des centaines de personnes et la mort de 40% à 50% d'entre elles. La situation s'est encore aggravée lors de l'apparition du virus Nipah au Bangladesh en 2001. En quelques années, la transmission est devenue indépendante d'hôtes intermédiaires. De récentes études ont même montré que le virus pourrait se transmettre directement d'homme à homme. Quant au taux de mortalité, il est monté jusqu'à 92%. Aujourd'hui encore, il n'existe ni traitement, ni vaccin disponible contre ces virus. Toutes ces caractéristiques leur valent la classification de virus P4.

Les études réalisées sur ces virus ont montré qu'il s'agissait d'un nouveau genre de Paramyxovirus très proche des Morbillivirus. Ce groupe a été nommé Henipavirus. Ces

virus utilisent comme récepteur cellulaire la protéine l'éphrineB2. C'est une molécule de chimiotactisme très conservée au cours de l'évolution, ce qui explique la capacité de ces virus à passer d'une espèce à l'autre. Beaucoup de mécanismes du cycle viral ont été supposés identiques à ceux des Morbillivirus et ont donc été peu étudiés, et même pas du tout vérifiés pour certains.

C'est justement en mettant en place des outils pour vérifier la conservation de l'un de ces mécanismes (la régulation négative du récepteur) entre Morbillivirus et Henipavirus qu'avec mon équipe j'ai pu montrer un mode d'entrée de ces virus unique parmi la grande famille des Paramyxoviridae. Ce mode d'entrée nécessite que la glycoprotéine G du virus mime le récepteur naturel de l'éphrineB2 : EphB4. En mimant cette molécule, le virus déclenche un mécanisme endocytaire connu sous le nom de Macropinocytose et qui nécessite une réorganisation du cytosquelette. La macropinocytose et la signalisation y conduisant sont bien connues, et de nombreux inhibiteurs existent pour les différentes étapes du processus. En utilisant ces inhibiteurs, nous avons réussi à bloquer l'entrée de ces virus, ce qui ouvre de nouvelles voies vers un traitement de ces virus, d'autant plus que certaines de ces drogues sont déjà utilisées en médecine.

L'étude du mécanisme d'entrée du virus Nipah m'a donc permis au cours de cette thèse de développer les premières stratégies thérapeutiques potentiellement applicables à l'homme. Des études plus poussées sur le sujet m'ont permis de constater que l'interaction entre glycoprotéine virale et récepteur cellulaire pouvait favoriser soit l'entrée du virus, soit sa dispersion aux cellules environnantes. J'ai aussi pu valider des hypothèses sur la résistance de certains rongeurs au virus ou sur les mécanismes moléculaires qui déclenchent la fusion des membranes virales et cellulaires.

Enfin, des études sur le terrain m'ont permis de montrer que les chauves-souris du Sud de la France ne sont apparemment pas contaminées par les Henipavirus, et ce, alors que d'autres équipes ont montré leur présence dans de plus en plus de pays, du Cambodge jusqu'en Afrique de l'Ouest.





**CHAPITRE PREMIER :**  
**RAPPORT BIBLIOGRAPHIQUE**

# I-Introduction

## *I-1-Les virus émergents et les zoonoses*

Les virus émergents sont des virus qui sont apparus brutalement aux yeux des scientifiques ces dernières années. Plusieurs causes peuvent expliquer l'émergence d'un virus. La plupart du temps, il s'agit d'un virus présent depuis longtemps mais jamais détecté. Avec les techniques biomoléculaires disponibles depuis trente ans (PCR, Elisa, etc) et leur amélioration (RT-PCR quantitative, bases de données informatiques, etc), il est devenu plus facile d'isoler et de découvrir de nouveaux virus. Une autre explication est que le virus devient plus accessible. Les moyens de communication et de transport sont de plus en plus développés ce qui permet aux humains (mais aussi aux animaux) de passer d'un continent à un autre en moins d'une journée. Ainsi, un virus africain peut se retrouver en Amérique du Nord, tel le virus West Nile, ou sur toute la planète tel le VIH. Dans le même esprit, l'accès massif de l'être humain à des zones jusque-là géographiquement isolées permet un plus grand contact avec les virus ; ainsi la déforestation permet des contacts d'humains et d'animaux domestiques avec des pathogènes issus des forêts vierges et pour lesquels leur système immunitaire n'est pas forcément adapté. Dans ce contexte, il n'est pas surprenant que plus de 60% des maladies émergentes soient des zoonoses (Jones2008). C'est le cas des Filoviridae, ainsi que du virus Nipah dont il sera question tout au long de cette thèse. Puis il y a aussi les phénomènes naturels de mutation, de recombinaison et d'évolution de certains virus, tel ceux de la grippe. Enfin, la surveillance mise en place pour les virus connus permet parfois de retrouver un virus oublié ou qui n'avait jamais été documenté, tel le virus du Chikungunya. On parle alors de ré-émergence.

Afin de bien cerner ces zoonoses émergentes dont sont responsables les virus Nipah et Hendra, ainsi que les problèmes liés à ce genre de virus, voici quelques exemples de virus émergents célèbres.

## *I-2-Quelques exemples de virus émergents*

### ***Le VIH : virus émergent par excellence***

Le VIH (virus de l'Immunodéficience Humaine) réunit à lui seul la plupart des caractéristiques des maladies émergentes citées plus haut : c'est une zoonose issue de l'entrée des humains dans les forêts humides et qui s'est développée grâce aux mouvements de populations intercontinentaux. Elle a été ignorée jusqu'à ce qu'un pays avec un système de veille sanitaire efficace soit touché.

Le VIH est donc issu des singes sauvages de la forêt humide africaine, et a conquis tous les continents. Colonisation, construction de routes ou simplement pour la chasse, l'homme s'est enfoncé au plus profond des forêts humides d'Afrique tout au long du XX<sup>e</sup> siècle. Des études phylogénétiques ont montré que les premiers cas « d'ancêtres du VIH » sont apparus entre 1915 et 1922, puis 1948, 1958 et 1967. De 1960 à 1980, les mouvements de populations ont été importants dans l'Est Africain ; et dans les années 1970, les échanges entre les continents se sont développés. L'épidémie s'étend, gagnant Haïti puis les États Unis, et enfin le reste du monde dans les années 1980 (Gray2009). Il aura fallu attendre que les États-Unis soient touchés pour que l'agent étiologique soit recherché et que l'émergence d'un nouveau virus soit caractérisée (Montagnier1984).

Le VIH est un rétrovirus d'origine simienne. On retrouve des virus similaires chez de nombreux mammifères, notamment les félins. Il se transmet par le sang et les muqueuses sexuelles. Le virus crée une immunosuppression toujours mortelle. Aujourd'hui encore, aucun traitement définitif ou vaccin efficace n'est disponible. La pandémie touche officiellement entre 40 et 60 millions de personnes.

### ***Les animaux domestiques et les zoonoses***

La faune sauvage est responsable d'environ 72% des zoonoses (Jones2008). Les 28% restant sont dus aux animaux domestiques. Compte tenu du développement démographique et agricole dans le monde ces 30 dernières années, l'élevage intensif (et le

commerce qui en résulte) peut rapidement déclencher de graves problèmes sanitaires en cas de zoonoses. L'Asie (60% de la population mondiale) a ainsi été le point de départ de nombreuses zoonoses émergentes récemment.

Parmi elles, une nouvelle souche de grippe A H5N1 est apparue chez les volailles en 1997 à Hong Kong (Bender1999)(Xu1999). Les virus de la grippe sont connus pour leur extrême variabilité (par mutation et recombinaison) permettant des ré-émergences régulières (annuelles la plupart du temps). Les gripes A H5N1 sont particulièrement dangereuses car leur tropisme n'est pas limité au tractus respiratoire et peuvent passer aux mammifères en cas de contacts rapprochés (Griffin2001). Des conditions sanitaires déplorables, une extrême proximité des élevages aviaires avec des élevages porcins et les habitations humaines facilitent grandement les transmissions inter-espèces, faisant de ces zones d'élevage et des marchés de véritables bombes virales à retardement (Chen2009). La dissémination des nouveaux virus peu se faire lors d'échanges commerciaux de bétails ou de contacts avec la faune sauvage (oiseaux migrateurs, canards sauvages,...)(Slemons1974).

L'émergence de ce genre de virus est relativement bien contenue grâce au principe de veille sanitaire. De gros progrès ont été réalisés depuis l'épidémie de Coronavirus du SRAS (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) en 2003. En Novembre 2002, la province chinoise de Guangdong (anciennement appelée Province de Canton) est le point de départ d'une épidémie d'une maladie inconnue. Elle provoque un syndrome respiratoire aigu sévère pouvant aller jusqu'à la mort (environ 10% des cas), d'où son nom de Syndrome Respiratoire Aigu Sévère. Le virus touche rapidement les grandes villes (Hong Kong et Beijing), puis le reste de l'Asie (Taiwan, Macao, Vietnam, Singapour, Mongolie, ...) et du monde (Canada, Etats-Unis d'Amérique, Koweït, Roumanie, Irlande, Suisse...). Le virus se transmet par les muqueuses, les gouttelettes de Pflug et est très contagieux. Le cas le plus extrême est la contamination lors d'un vol Hong Kong – Beijing (3 heures environ) de 22 passagers sur 120. Cette épidémie qui toucha 8 000 personnes pendant neuf mois fut une catastrophe sociale et économique. Issu d'une ferme, le SRAS CoV sera rétrospectivement retrouvé chez 80% des civettes vendues sur les marchés de Guangzhu (anciennement Canton). Son apparition chez l'humain a mis en lumière les dangers de l'élevage intensif anarchique.

On sait aujourd'hui que les animaux de ferme ont été contaminés par la faune sauvage. Le réservoir le plus probable est les chauves-souris *Rhinolophinae* que nous étudierons plus tard (Cheng2007).

## **Les Filoviridae**

En 1967, à Marburg (Hesse, Allemagne) plusieurs personnes sont touchées par une fièvre hémorragique inconnue. La même maladie apparaît aussi à Francfort-sur-le-Main (Hesse, Allemagne) et à Belgrade (Serbie, ex-Yougoslavie). Cette nouvelle maladie est transmise par des singes verts ou vervets (ex-*Cercopithecus aethiops*, aujourd'hui *Chlorocebus aethiops*) importés d'Ouganda pour produire des vaccins anti-poliomyélites. Les premiers cas, soit vingt cinq patients, sont des scientifiques en contact avec ces singes. Sept d'entre eux en perdent la vie. Par la suite, six autres cas se déclarent, tous ayant eu des contacts avec les vingt cinq malades d'origine. L'agent étiologique fait partie d'une nouvelle famille de virus, les Filoviridae. Ils sont nommés d'après la forme des virions, tout en longueur. Mis à part quelques cas isolés, il n'y a pas eu d'épidémie avant 1998 (Mahanty2004)(Bausch2003).

En 1976, un virus très proche du virus de Marburg est responsable d'une épidémie dans le Sud-Ouest du Soudan. C'est le virus Ebola. On compte aujourd'hui 5 espèces d'Ebola : Bundibugyo, Côte d'Ivoire, Reston, Soudan et Zaïre. Bien que les Ebolavirus soient généralement mortels à plus 90% (dans les cas de Soudan et Zaïre), Reston et Bundibugyo n'ont jamais été associés à une épidémie (Mahanty2004). Les grand singes sont particulièrement touchés ; rien que pour la région Gabon/Congo, le virus Zaïre aurait tué plus de 5000 gorilles entre 2002 et 2003, soit plus que le braconnage (Bermejo2006). C'est d'ailleurs lors de contacts avec des singes infectés que commence la plupart des épidémies humaines (Mahanty2004). De plus, des porcs ont contracté le virus Reston aux Philippines (Barrette2009).

Les malades présentent des symptômes proches de ceux observés lors de paludisme ou de fièvre jaune (fièvre, frissons, maux de tête, nausées, myalgies, diarrhées). Le virus s'attaque aux cellules parenchymateuses, provoquant plusieurs foyers hémorragiques, notamment au niveau du tractus gastro-intestinal ainsi que dans le système urinaire. Les foyers d'infection nécrosent, donnant l'impression que les organes se sont liquéfiés (Mahanty2004). Aujourd'hui encore, on ne connaît ni traitement ni vaccin contre les Filoviridae ; ils sont donc classés P4 (ou BSL-4 pour *BioSafety Level 4*, Niveau de Sécurité Biologique 4), c'est-à-dire la catégorie la plus dangereuse de virus. Ils sont aussi considérés comme des armes biologique par de nombreux pays, notamment aux États-Unis.

Des études publiées récemment confirment ce qui était suspecté depuis longtemps. Elles montrent que le réservoir de ce virus n'est ni l'homme, ni les singes, ni les porcs, mais les chauves-souris. Plusieurs espèces de plusieurs genres sont suspectées. Le virus peut être transmis aussi bien par des Mégachiroptères, de grandes chauves-souris frugivores (*Leroy2005*)(*Towner2007*), que par des Microchiroptères, petites et insectivores (*Swanepoel1996*).

De nombreux autres virus, et plus généralement pathogènes, sont apparus ces dernières années. Certains ont des conséquences très violentes : Fièvre de Lassa, Fièvre Hémorragique d'Omsk, les Arenavirus de Junin et de Machupo, la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo, les Fièvre Hémorragique avec Syndrome Rénal, etc. Parmi ces virus émergents, je vais maintenant me concentrer sur deux en particulier : les virus Hendra et Nipah ou Hénipavirus.

## **II-Les Henipavirus**

### ***II-1-L'émergence du virus Hendra***

En 1994, une maladie inconnue frappe une écurie australienne à Hendra, dans la banlieue de Brisbane, Queensland. La Melbourne Cup, le plus important événement sportif d'Australie est menacé par un nouveau Morbillivirus (Morbillivirus Equin).

A Hendra, 17 chevaux de course sont contaminés. L'entraîneur Vic Rail, un palefrenier et un vétérinaire tentent par tous les moyens de sauver l'écurie en soignant, tant bien que mal, les chevaux malades. Les premiers cas semblent liés à l'arrivée d'une jument gestante transférée depuis Cannon Hill le 7 septembre 1994. Malade à son arrivée, elle est morte deux jours plus tard. Dans les vingt jours qui suivirent son arrivée, 12 autres chevaux en contact avec la jument sont morts (*Murray1995#18*).

Les chevaux contaminés présentaient des troubles neurologiques et respiratoires, dépression, anorexie, fièvre (41°C), dyspnée, ataxie, tachycardie, tachypnée et écoulement nasal très mousseux (Selvey1995) Leurs écuries étaient couvertes de sang. Les autopsies ont révélé de nombreux œdèmes pulmonaires et des hémorragies internes (Gardner1994 ). La semaine suivant la mort de la jument, l'entraîneur et le palefrenier, qui s'étaient fortement impliqués dans les soins des chevaux, présentèrent les mêmes symptômes que les chevaux infectés. L'entraîneur est décédé six jours après les premiers symptômes d'un arrêt cardiaque. Le palefrenier survécu. Quant aux chevaux, 14 sur 21 sont morts de l'infection. Un Morbillivirus a été isolé dans les poumons de 5 chevaux malades. Le même virus a été découvert dans leurs reins (Selvey1995).

Les analyses des syncytia formés par l'agent étiologique au niveau des capillaires pulmonaires, ainsi que des études structurales en microscopie électronique ont montré qu'il s'agissait d'un Morbillivirus : enveloppé, pléiomorphe dont la taille varie entre 38 et 600nm. La nucléocapside observée est d'un diamètre de 18nm et d'une période de 5nm en chevrons, ce qui correspond à un Morbillivirus. Cependant, ce virus possède des caractéristiques inhabituelles pour un Morbillivirus : à la surface, l'enveloppe est recouverte de deux types de glycoprotéine dont les tailles - 10 et 18nm - diffèrent fortement. Les analyses génétiques par amplification des séquences conservées au niveau du gène de la protéine de matrice confirment qu'il s'agit d'un Morbillivirus (Murray1995) .L'isolation de ce virus et l'infection de chevaux sains par ce dernier a permis de montrer qu'il s'agissait de l'agent étiologique de la maladie (Gardner1994 ).

Plus tard, en 1995, un autre cas humain fut rétrospectivement attribué au virus désormais renommé virus Hendra. L'infection avait eu lieu dans une ferme près de Mackay (950km au nord de Brisbane) au mois d'août 1994 et avait entraîné la mort de 2 chevaux. Le fermier et sa femme (vétérinaire) avaient alors réalisé eux-mêmes l'autopsie des chevaux. C'est après un an d'encéphalite récurrente qu'est mort le fermier (Halpin1999)





Figure 1 : Carte de l'Australie montrant les principales villes victimes du virus Hendra : Brisbane, Mackay, Cairns et Rockhampton (source : The World Factbook – Domaine public)

Suite à cette première apparition de Hendra, 1964 chevaux provenant de 630 écuries, ainsi que 90 personnes y travaillant, ont été testés sérologiquement. Seuls 7 chevaux ont été détectés positifs pour le virus Hendra. Ils venaient tous de l'écurie de Vic Rail ou des écuries adjacentes. Les résultats montraient que les infections équines et humaines étaient rares, accidentelles et par conséquent le cheval et l'homme ne peuvent pas être considérés comme des hôtes habituels de ce virus (Murray1995)(Murray1995#18). Des tests sur la faune sauvage (plus de 5000 échantillons, provenant de 46 espèces différentes) ont alors été réalisés, sans succès (Young1996).

La deuxième flambée de virus Hendra a permis de réduire le nombre d'hôtes naturels possibles. Deux sources d'infection ont alors été suspectées : les échassiers migrateurs et les chauves-souris frugivores. Ce sont les seuls animaux communs aux deux régions pouvant entrer en contact avec les chevaux. 224 chauves-souris du sous-ordre Megachiroptera ont été testées et des anticorps neutralisant ont été détectés chez 9% d'entre-elles. Depuis, les chauves-souris frugivores sont considérées comme le principal réservoir du virus (Young1996)(Halpin1999).

Depuis, le virus Hendra frappe périodiquement les écuries australiennes. En 2004, un vétérinaire traitant des chevaux infectés près de Cairns développa une forme légère de la maladie et survécut. En 2008, deux vétérinaires en charge d'une épidémie à Redlands, près de Brisbane furent infectés. Dr. Ben Cuneen ne survécut pas à la maladie. Enfin, en 2009, une flambée dans une écurie de Rockhampton (Queensland) couta la vie à un autre vétérinaire, Dr. Alister Rodgers. Il avait été particulièrement exposé (pas de masque, ni de gants) lors d'une intervention sur un cheval soupçonné de souffrir d'une morsure de serpent. Trois autres personnes ont été placées en observation et un traitement a même été testé. Ces derniers événements ont traumatisés la communauté vétérinaire australienne et le virus Hendra est devenu la bête noire de cette profession.

## *II-2-L'émergence du virus Nipah*

### **La souche Malaisienne**

En Septembre 1998, le Ministère de Santé Malaisien recensa un foyer d'encéphalite fébrile près de la ville d'Ipoh. En Décembre 1998, deux autres foyers furent recensés près de Sikamat et de Bukit Pelandok. Le premier virus suspecté fut celui de l'encéphalite japonaise (JEV) (CDC1999)(Chua1999)(Chua2000). Le JEV est un flavivirus transmis à l'homme par le moustique et est endémique en Malaisie (Sinniah1989) (Mackenzie2005). Le gouvernement malaisien pris alors les dispositions nécessaires pour lutter contre cette épidémie : démoustication, vaccination, etc. Mais la plupart des malades étaient employés dans l'élevage porcin, ce qui est étrange pour une épidémie arbovirale. Des analyses menées par le CDC montrèrent la présence d'antigènes viraux réagissant avec des sera spécifiques au virus Hendra dans 88% des cas. Ces antigènes furent aussi détectés dans les échantillons de porc prélevés dans les élevages concernés. En Mars 1999, l'épidémie toucha Singapour : onze employés d'abattoirs ayant importé des porcs de Malaisie (CDC1999). Pour pouvoir enrayer l'épidémie, près d'un million de porcs ont du être abattus.

Au final, ce sont 265 cas qui ont été répertoriés. 106 d'entre eux furent fatals, soit un taux de mortalité de 40%. Le nouveau virus fut appelé Nipah virus, d'après le nom du village où avait été réalisé le prélèvement qui a permis son isolation. D'après les résultats sérologiques, ce nouveau virus est très proche du virus Hendra. C'est un Paramyxovirus zoonotique (ce qui est assez rare comme je l'expliquerai plus loin) dont le génome est d'environ 20% plus grand que celui des Paramyxovirus connus jusqu'à l'apparition du virus Hendra.

Au cours de l'épidémie, une famille Malaisienne fut contaminée. La seule survivante fut une jeune fille de 12 ans. Ayant perdu ses parents, elle quitta la péninsule pour le Sarawak, province Malaisienne située sur l'île de Bornéo, où vivaient des parents éloignés. Aucun cas de virus Nipah n'avait jamais frappé Bornéo durant toute l'épidémie. Pourtant, un an après son arrivée, elle présenta des signes cliniques d'infection par le virus Nipah, notamment les symptômes neurologiques. Il s'agit du premier cas de rechute observé.



Figure 2 : Carte de la Malaisie (source : The World Factbook - Domaine Public)

Symptômes cliniques	% de malades
Fièvre	100
Somnolence	88
Maux de tête	82
Désorientation, confusion	76
Étourdissement	61
Myalgie	54
Symptômes respiratoires, toux	40
Convulsion	28
Vomissement	19
Signes cliniques	
Réduction de la conscience	89
Perte des réflexes	50
Apoplexie	40
Paralysie nerveuse faciale	29
Pseudo méningite	10
Brûlures d'estomac	5

Figure 3 : Liste des symptômes et signes cliniques recensés lors d'infections par le virus Nipah et le pourcentage de patients présentant ces symptômes et signes (Wong2002).

avec le virus Nipah. Il semble que le virus puisse rester dormant dans les cellules nerveuses des personnes ayant résolu l'infection. La jeune fille a survécu une nouvelle fois au virus et mène depuis une vie normale. On estime à 10% la proportion de survivants dans le cas de cette jeune fille. Plusieurs mois (entre 2 et 48) après une première contamination, ils font une rechute. Les rechutes sont mortelles dans 18% des cas (Eaton2006)

Expérimentalement, le virus s'est montré capable d'infecter de nombreuses espèces : en plus des chevaux, des porcs et de l'homme, le virus infecte aussi les chats, furets, hamsters..... mais n'infecte pas les souris. Comme les hamsters infectés présentent la même chronologie et les mêmes symptômes que ceux observés chez les êtres humains, le Hamster doré (*Mesocricetus auratus*) est donc devenu le modèle animal de prédilection pour étudier les virus Nipah et Hendra (Wong2003).

### ***La souche Bangladeshie***

En Avril 2001, le Bangladesh enregistra une épidémie d'un nouveau genre dans les porcheries de Meherpur, région située près de la frontière Indienne. Notons ici que le Bangladesh est un pays dont la population est majoritairement musulmane (60%), et le porc n'y est élevé que de manière marginale par les minorités ethniques (chinoises, indiennes). Les noms alors associés à cette épidémie résument assez bien la pathologie chez les porcs. On parle du « syndrome du porc aboyant » (*Barking pig syndrome*) ou de « toux audible à un mile » (*One mile cough*) (Hsu2004).

Rapidement, les éleveurs et leurs proches sont à leur tour touchés par la maladie. Treize personnes au total sont contaminées, neuf d'entre elles meurent dans les six jours, soit un taux de mortalité de 69%. Le CDC a rapidement montré la présence d'anticorps anti-Nipah dans deux prélèvements réalisés sur place, mais les recherches s'arrêtèrent là. Une étude rétrospective dans les villages touchés (Chandpur et Sishipara) montrera que deux autres patients étaient séropositifs pour le virus Nipah (Hsu2004). Dans le même temps, une épidémie a lieu au Siliguri, en Inde, près de la frontière avec le Nord-Est du Bangladesh.

En Janvier 2003, une épidémie du même genre touche la région de Naogaon, située à 150 km de Meherpur. Dans les villages de Chalksita et Biljoania, douze personnes (soit 1,1% de la population), sont touchées. Tout comme lors de l'épidémie de Chandpur, huit personnes proches les unes des autres succombent au virus (67%).

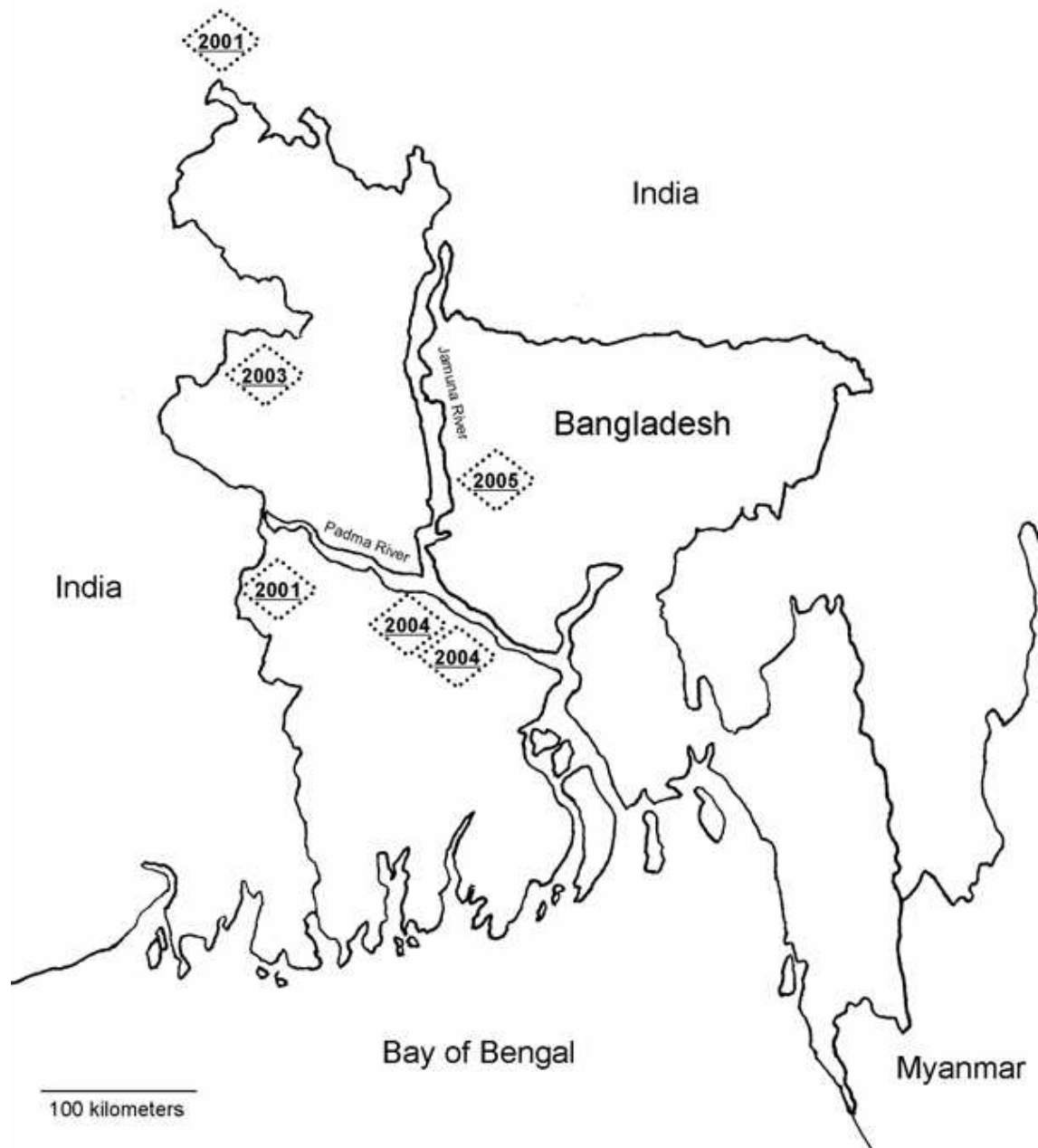


Figure 4 : carte du Bangladesh montrant les principales apparitions du virus Nipah avec leurs dates respectives (Sources : Luby et al, 2006)

Qu'il s'agisse de Chandpur ou de Chalkista, les chauves-souris frugivores *Pteropus giganteus* sont très présentes dans les villages. Des tests sérologiques sur ces animaux ont montré la présence d'anticorps anti-Nipah chez deux femelles adultes, alors que ceux pratiqués sur d'autres animaux (oiseaux, chiens, rongeurs) se sont révélés négatifs. Dans le cas de Chalkista, même les porcs sont séronégatifs. Le contact avec les porcs malades n'est donc plus nécessaire. C'est la première fois que des transmissions à des humains sans contact avec les porcs furent recensées. Ce qui signifie que le virus peut passer des chauves-souris aux humains sans passer par le porc (Hsu2004).

En 2004, deux nouvelles épidémies situées à 30 km l'une de l'autre (précisément à Faridpur et Rajbari) éclatent dans le centre du pays. Quarante huit cas sont répertoriés, pour un taux de mortalité de 75%. La séquence génétique du virus Nipah est alors étudiée en détail. Les analyses montrent que ces deux épidémies ne sont pas liées à celles de 2001 et 2003, ni à la souche de Malaisie. Ce virus Nipah possède six nucléotides de plus que celui de 1998, situé dans la région 5' non traduite de la glycoprotéine F. De plus, quatre mutations se trouvent dans le peptide de fusion. Au niveau de la Glycoprotéine G, 6 glycosylations sur 8 sont conservées. Les cadres de lecture sont les mêmes, sauf pour la protéine V. D'une manière globale, les similarités avec la souche malaisienne sont de 92%. Cette fois, le virus se transmet directement d'homme à homme et le taux de mortalité est en augmentation.

En Janvier 2005, huit personnes meurent d'encéphalite à Basail Upazila dans la région de Tangail. L'enquête de l' ICDDRDB montre que le virus Nipah a infecté douze personnes. A la fin de l'épidémie, une seule d'entre-elles est toujours en vie, soit un taux de mortalité de 92%. Aucun des malades n'est entré en contact physique ou n'a mangé de chauves-souris ou de porc dans la période précédant l'épidémie, mais 64% d'entre eux consomment du lait de palme frais (*Phoenix sylvestris*) en provenance d'une même plantation. Ce lait y est récupéré traditionnellement de décembre à février, et la plantation attire les chauves-souris qui viennent s'y nourrir. Le fils du propriétaire de cette plantation fut parmi les victimes de cette épidémie, de même que les proches à qui il avait offert du lait de palme. (Luby2006)

Depuis, le virus sévit régulièrement. Tous les ans, au moment de l'hiver (du mois de janvier à celui de mai) le virus Nipah réapparaît de façon sporadique au Bangladesh ou en Inde à la proximité de la frontière. (Luby2006)



Figure 5 : *Phoenix sylvestris* ou Palmier utilisé pour la production de lait de palme au Bangladesh. Photo prise à Purbasthali au Bengal Occidental, Inde. (Source : J.M. Garg – Creative Commons)

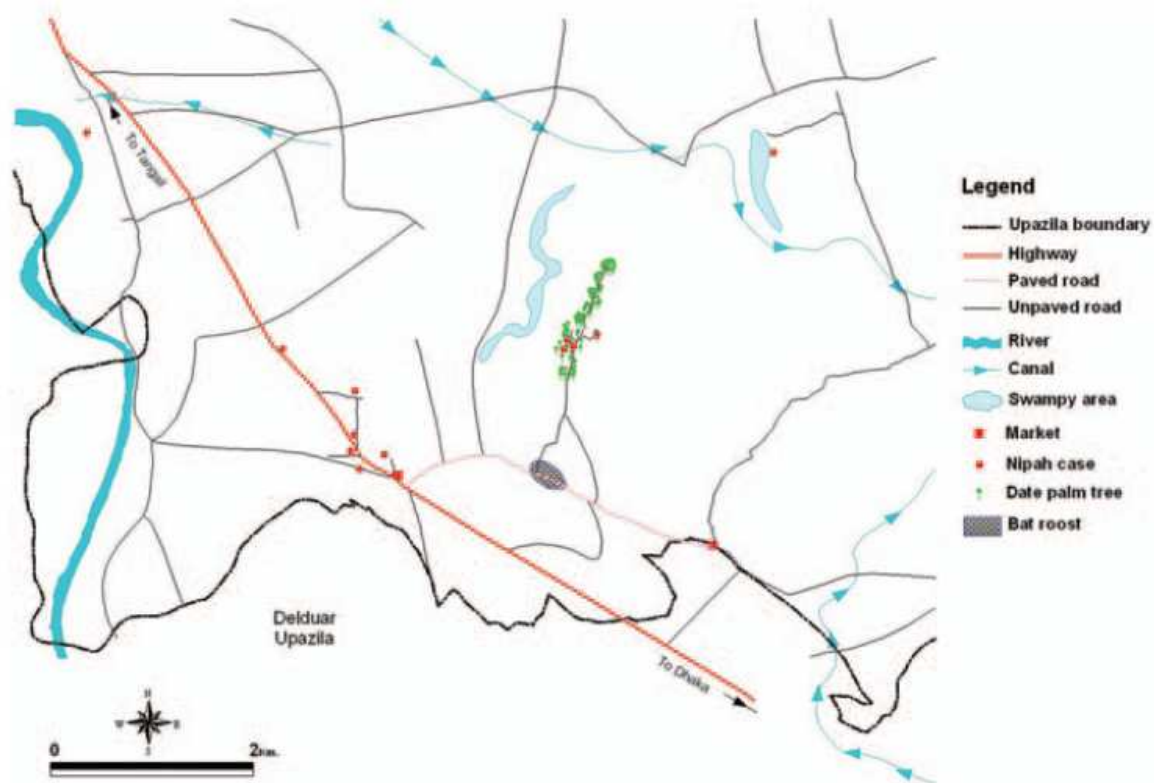


Figure 6 : L'épidémie de 2005 : les cas (points rouges) étaient dus à du lait de palme contaminé transporté d'un marché à un autre (carrés rouges). Les palmiers (points verts) étaient cultivés près d'un nid de chauves-souris (tache grise) (Luby2006)



## ***II-3-Comparaison entre Nipah et Hendra***

### **Réservoirs et Hôtes intermédiaires**

Quel que soit l'épidémie liée aux Henipavirus, le réservoir est toujours une chauve-souris frugivore (Megachiroptera) du genre *Pteropus* : *P. conspicillatus*, *P. alecto*, *P. scapulatus* et *P. poliocephalus* en Australie (Young1996), *P. giganteus* au Bangladesh (Hsu2004)(Luby2006)

En Australie, les épidémies de virus Hendra débutent toujours par l'infection d'un cheval, souvent dans une écurie de course. En Malaisie et au Bangladesh, le virus Nipah attaque d'abord les porcheries. Dans les cas récents de Nipah, la présence d'un hôte intermédiaire n'est plus nécessaire depuis 2003, puisque le virus passe directement de chauve-souris à l'homme par l'alimentation ou directement d'homme à homme (Luby2006).

### **Structure**

La morphologie des Henipavirus permet dans certains cas de différencier le virus Hendra du virus Nipah. Ainsi, le virus Hendra a une morphologie unique parmi les Morbillivirus : observé au microscope électronique, il est le seul à avoir des projections (glycoprotéines) doubles à sa surface (Hyatt2001).

### **Pathologie**

Chez leurs hôtes intermédiaires respectifs (cheval, porc), les virus Hendra et Nipah n'induisent pas les mêmes signes pathologiques : dans le cas du virus Hendra, la réplication a principalement lieu dans les cellules endothéliales des chevaux, alors que le virus Nipah se réplique dans les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires des porcs, y

provoquant l'apparition de structures tubulaires. L'infection induit dans les deux cas la formation de syncytia typiques des Morbillivirus. Une étude de ces syncytia permet de différencier les deux types d'infection. Dans le cas de Hendra, les noyaux sont regroupés au centre des syncytia, alors qu'avec Nipah, on les retrouve en périphérie (Hyatt2001)..

Chez l'homme, les Henipavirus provoquent des encéphalites, et l'observation des cerveaux infectés par résonance magnétique permet de différencier les deux virus. Dans le cas d'une encéphalite due au virus Hendra, on observe des lésions corticales éparses, très proches de celles observées lors de sclérose subaiguë panencéphalique (PESS), une complication due au virus de la rougeole (Morbillivirus) dont nous reparlerons (Lim2000). Dans le cas du virus Nipah, on observe de nombreuses petites lésions (entre 2 et 7mm) hyper-intenses lors d'analyses par résonance magnétique (IRM T<sup>2</sup>), dans la matière blanche sub-corticale (et plus profondément) mais aussi en région corticale dans la matière grise. En cas de rechute, ces lésions deviennent confluentes, principalement dans la matière grise (Goh2000)(Sarji2000) .

#### *II-4-Les Henipavirus dans le monde*

Pour l'instant, seulement cinq pays ont été des foyers d'infection humaine : l'Australie, la Malaisie, Singapour, le Bangladesh et l'Inde. Mais les Henipavirus sont présents ailleurs dans le monde. Une raison simple à cela est l'étendue de leur réservoir. En effet, les chauves-souris sont les seuls mammifères, avec les humains, à avoir conquis tous les continents (y compris l'Antarctique), et les chauves-souris frugivores sont présentes tout autour du monde, au niveau des tropiques. Des Henipavirus ont donc été cherchés et trouvés ailleurs que dans les pays touchés par les cas humains.

## **Asie du Sud Est**

En plus de la Péninsule Malaisienne, le virus Nipah a été détecté au Cambodge, en Thaïlande, en République Populaire de Chine et plus récemment sur l'île de Bornéo.

Au Cambodge, une étude sur 96 *Pteropus lylei* publiée en 2002 a montré la présence d'anticorps anti-Henipavirus dans 11,5% des cas (Olson2002). En 2005, l'Institut Pasteur et la Wildlife Conservation Society de Phnom Penh publient une étude montrant que ces mêmes *P. lylei* sont porteuses du virus Nipah. Les analyses réalisées sur d'autres chauves-souris sont toutes négatives (Reynes2005).

En Thaïlande, des anticorps anti-Nipah ont été détectés chez trois espèces de chauves-souris frugivores (*P. lylei*, *P. vampyrus*, *P. hypomelanus*) et une espèce insectivore (*Hipposideros armiger*) (Wacharapluesadee2005)

Au Nord de la Thaïlande, dans les provinces chinoises de Yunnan, Hainan et de Guangdong, quelques chauves-souris ont été testées séropositives pour les Henipavirus entre 2004 et 2007. Parmi les espèces ayant des membres séropositifs, on trouve des frugivores (*Rousettus leschenaultia*, *H. armiger* et *H. pomona*) et des insectivores dont les Murins (*Myotis daubentonii* et *M. ricketti*) des Minioptères (*Miniopterus spp.*) et des *Rhinolophidae* (*Rinolophus luctus* et *R. affinis*). Aucune chauve-souris n'a été testée positive dans les autres provinces (Hunan, Hubei, Tianjin, Shanxi, Guizhou et Henan) où a été réalisée cette étude (Li2008).

Enfin, sur l'île de Bornéo, dans la région Indonésienne du Kalimantan Occidental, une étude chez les porcs et les chauves-souris a montré que ni les porcs et ni les petites chauves-souris frugivores *Cynopterus brachyotis* n'étaient infectés alors que près de 20% des *P. vampyrus* sont séropositives pour le virus Nipah (Sendow2006)(Sendow2009).

### ***Afrique de l'Est : Madagascar***

Des études sérologiques ont montré la présence d'anticorps anti-Henipavirus chez les chauves-souris de Madagascar. Madagascar est une île particulièrement intéressante puisqu'on y trouve à la fois des chauves-souris des genres *Pteropus* et *Eidolon*. C'est d'ailleurs chez des populations de ces deux espèces de chauves-souris frugivores (*Pteropus rufus*, *Eidolon dupreanum*), ainsi que chez des *Rousettus madagascariensis* que des anticorps anti-Henipavirus ont été détectés par l'Institut Pasteur de Madagascar (Iehlé2007)

### ***Afrique de l'Ouest : Ghana***

En 2008, une étude réalisée au Ghana montrait la présence d'anticorps anti-Henipavirus chez les chauves-souris *Eidolon helvum*. (Hayman2008). Une étude plus complète a été publiée récemment (Drexler2009). Elle montre la présence d'Henipavirus chez les chauves-souris *Eidolon helvum* du Parc zoologique de Kumasi, au Ghana. Cette fois-ci, il ne s'agit pas seulement d'études sérologiques, mais de détection d'ARN viral par RT-PCR. Le virus a été détecté dans trois prélèvements fécaux (sur 215 au total). Cependant, le séquençage de son génome n'étant pas assez avancé, il n'a pas été possible aux auteurs de déterminer s'il s'agissait d'une nouvelle souche ou d'un nouveau virus. La particularité de cette étude viens du fait que les prélèvements ont été réalisés en milieu urbain (Drexler2009).



Figure 7 : Les réservoirs des Henipavirus et leur répartition : la Roussette Océanique *Pteropus alecto* (ci-dessus) et l'Africaine *Eidolon helvum* (ci contre). Sur la carte, les domaines des *Pteropus* sont en rouge et ceux des *Eidolon* en bleu (Sources : Welbergen – CC ; F. Spangenberg - CC)

## **II-5-Les réservoirs du virus**

### **Les Roussettes Océaniques**

Comme nous l'avons vu précédemment, les premières chauves-souris à avoir été reconnues porteuses du virus ont été les Roussettes (*Pteropus spp.*). Ce sont des Mégachiroptera, comme cité plus haut, toutes frugivores et sont parmi les rares mammifères présents en Australie et en Nouvelle Zélande arrivés avant les européens. On trouve des Roussettes tout autour de l'Océan Indien et de l'Océanie, depuis l'Afrique de l'Est (Somalie, Zimbabwe) jusqu'aux Iles Océaniques du Pacifique (Iles Fidji, Micronésie,...), du sud de la Péninsule Arabique et de la Chaîne Himalayenne (Iran, Afghanistan, Pakistan, Inde) jusqu'à Madagascar et l'Australie (Queensland, Territoire du Nord). En Australie, elles sont protégées.

Elles sont capables de voyager sur de très longues distances, entre les Iles Océaniques et Indonésiennes. Récemment, il a été démontré que des *Pteropus niger* ont atteint l'Ile Maurice depuis l'Ile de la Réunion.

### **Les Roussettes Africaines**

Les *Eidolon helvum* (Kerr, 1792), ou Roussettes Paillées Africaines, sont des chauves-souris frugivores présentes sur tout le Continent Afrique. Elles forment des colonies allant de 100 000 à 1 000 000 d'individus. Ces colonies sont capables de migrations transcontinentales, pouvant voyager sur plus de 2 000 km. Récemment, la population de ces chauves-souris a fortement diminué, et malgré leur abondance sur tout le continent africain, l'IUCN l'a classée NT (*Near Threatened*, presque menacée).

## **Les Microchiroptera**

En Malaisie, une Scotophile de Kuhl (*Scotophilus kuhlii*) a été testée séropositive aux Henipavirus (Yob2001). Une étude plus large, réalisée en République Populaire de Chine, montre que de nombreux Microchiroptères peuvent être contaminés (Li2008) et notamment :

Les Murins : Les Murins de Daubenton (*Myotis daubentonii* ; Kuhl, 1817) et *Myotis ricketteni* (Thomas, 1894). *M. daubentonii* est présent en Europe et en Asie. C'est une petite chauve souris de 5 cm de haut environ pour 15 grammes maximum. *Myotis ricketteni* est présent en Extrême Orient, surtout le long de la façade pacifique de la Chine. Au Sud, on la trouve jusqu'à l'Ile de Hainan et au Nord jusqu'à Beijing. Ils vivent dans des grottes situés dans les gorges creusée par les rivières (Zhang1997)(Ma2003).

Les Rhinolophes : Les Rhinolophes sont de petites chauves-souris avec un nez en forme de fer à cheval qui lui permet d'émettre des ultrasons (alors que les autres chauves-souris utilisent leur bouche). On les trouve aussi bien autour de la Méditerranée que sur la côte pacifique de la Chine ou dans les montagnes (jusqu'à 1700 mètres pour *Rhinolophus affinis*). Parmi les espèces testées positives, on trouve *R.sinicus* et *R.affinis*. Ces deux chauves-souris sont présentes essentiellement en Chine (et plus généralement en Asie du Sud Est), au Népal, en Inde (Zhang1997)(Csorba2003)

Les Minioptères : Les Minioptères sont des Microchiroptera de l'Ancien Monde. Elles ne mesurent que quelques centimètres de long et sont insectivores. Leur grande consommation nutritionnelle (arthropodes, surtout des lépidoptères pour les espèces françaises) est un élément très important de la régulation de leur écosystème. Elles sont capables de parcourir de très longues distances : ainsi, des animaux bagués on été retrouvés à plus de 500 km. En Europe, c'est un animal dont l'environnement naturel est menacé et la nourriture empoisonnée par les insecticides (SFEPM2008).

Dans certaines zones contaminées du Cambodge, certaines Microchiroptères comme les Scotophiles de Kuhl restent négatives malgré tout (Reynes2005).



*Figure 8 : Un Rhinolophe (en haut) et des Minioptères (en bas) pris en photo dans les gorges du Gardon (France, 30). (Source : Arnaud Parvillé)*



Famille	Sous-famille	Genre	virus	Maladie associée
Paramyxoviridae	Paramyxovirinae	Avulavirus	NDV	Maladie de Newcastle
		Rubulavirus	Mumps virus	Oreillons
			hPIV2	Bronchite
			SV5	
		Morbillivirus	Measles virus	rougeole
			Canine Distemper virus	Maladie de Carré (chiens)
		Henipavirus	Nipah virus	Encéphalites
			Hendra virus	Encéphalites
		Respirovirus	hPIV3	Bronchite
			Sendaï virus	virus de Sendaï (murin)
	Pneumovirinae	Pneumovirus	VRS	Inflammation légère des voies respiratoires
		Metpneumovirus	hMPV	Bronchites

Figure 9 : Tableau de classification simplifiée des Paramyxoviridae

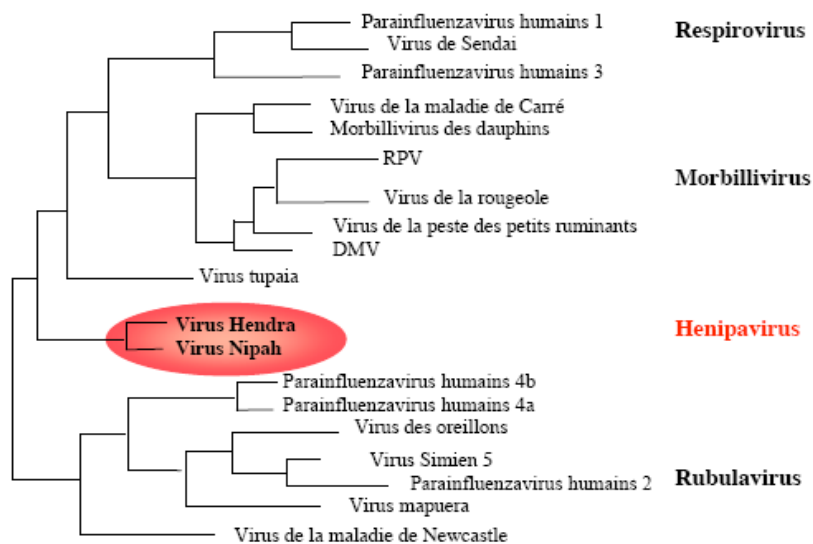


Figure 10 : Arbre phylogénique simplifié des Paramyxoviridae (D'après Harcourt et al, 2000 )

## III-Phylogénie et virus apparentés

### *III-1-Généralités concernant les Paramyxovirus*

Les Paramyxovirus sont virus à ARN négatif monocaténaire non segmenté (Mononégavirales), mais dont les virions contiennent un nombre variable de génomes (Griffin2001)(Takeda2005). Le génome est protégé par un complexe ribonucléoprotéique qui sera détaillé plus tard. Les particules virales sont de formes et de tailles variables, mais généralement de l'ordre de 100nm (Ciancanelli2006). Il existe deux sous-familles : les Pneumovirinae et les Paramyxovirinae.

Les Paramyxovirinae sont de plusieurs genres :

- Les Respirivirus sont des virus qui s'attaquent généralement aux voies respiratoires en se liant à l'acide sialique grâce à leur glycoprotéine de surface Hémagglutinine. Ils sont pourvus d'une Neuraminidase qui permet de limiter les surinfections. De plus, cette neuraminidase permet aux virions nouvellement formés de ne pas se ré-attacher à la cellule productrice. Les Respirivirus les plus connus sont les parainfluenza humains de type 3 (hPIV3) et le virus de Sendai (Griffin2001)
- Les Rubulavirus, dont le prototype le plus connu est le virus des Oreillons. Ils possèdent une glycoprotéine Hémagglutinine-Neuraminidase ainsi qu' une glycoprotéine de Fusion F et utilise l'acide sialique comme récepteur (Griffin2001).
- Les Morbillivirus ont aussi une Hémagglutinine (glycoprotéine H) mais leur récepteur est de nature protéique (Griffin2001) et ne possède pas de Neuraminidase. Comme nous le verrons plus tard, cette absence d'activité neuraminidase est très importante. Ils régulent négativement ce récepteur, limitant les surinfections et le ré-attachement des virions nouvellement formés (Naniche1993)(Galbraith1998). Ils sont réputés spécifiques d'une seule espèce hôte mais comme nous le verrons par la suite, ce dogme n'est plus d'actualité (Visser1993).

- Les Henipavirus ont été classés à part, malgré leur grande ressemblance avec les Morbillivirus. Depuis les épidémies de Hendra en 1994 et de Malaisie en 1998, de nombreux paramyxoviridae ont été découverts dans l'écozone australasienne et ne sont pas toujours classables. Le virus de Tioman et son proche voisin le virus de Menangle sont respectivement issus des chauves-souris malaisiennes et des porcs australiens (Chua2001). Depuis peu, on sait que les chauves-souris Australiennes peuvent être porteuses du virus Menangle (Philbey2008), un schéma déjà observé avec le virus Hendra. Ils ont été rapprochés des Rubulavirus (Chua2001). D'autres sont toujours extérieurs aux groupes phylogéniques existants, tel le Paramyxovirus du Tupaia.

### ***III-2-Les Morbillivirus***

Les virus de la rougeole et de la maladie de Carré sont deux Morbillivirus très proches génétiquement des Henipavirus. Leur impact en médecine humaine et vétérinaire est tel qu'ils sont étudiés depuis très longtemps (plusieurs dizaines d'années, voire plusieurs siècles pour la rougeole), et les connaissances accumulées à leur sujet sont les bases de nombreux dogmes et études concernant les Henipavirus. L'étude de l'un de ces genre apporte souvent des informations précieuses pour l'étude de l'autre. Voici donc une petite présentation de ces deux Morbillivirus.

#### ***Le virus de la rougeole***

Le virus de la rougeole est un des Paramyxovirus les plus étudiés en laboratoire. Les premières descriptions datent du 6<sup>em</sup> siècle et les premières études (par Abu Bakr) du 9<sup>em</sup> siècle. Il est responsable de la rougeole, ou 1<sup>ere</sup> Maladie et est probablement passé du bétail à l'homme dans les élevages Sumériens, au Moyen Orient (-3000 av. J.C.). Après dix jours d'incubation, le virus provoque des macules au centre blanc sur les joues (signe de Köplick), un exanthème maculo-papuleux typique qui s'étend sur toute la peau. La guérison se fait dans les huit jours (Griffin2001).

Très contagieux, le virus de la rougeole cause des centaines de milliers de morts par an (345 000 morts en 2005). C'est une maladie infantile, souvent mortelle pour les populations en état de sous-nutrition (10% des décès dans certaines régions africaines). Première cause de mortalité en 1960, elle touchait alors 135 millions d'enfants et en tuait 6 millions. Depuis, une souche vaccinale a été mise au point et utilisée pour l'immunisation massive des enfants. Le nombre de cas a été divisé par 10 aux USA moins de trois ans après l'introduction du vaccin (Griffin2001)

Mais le virus peut rester latent, silencieux dans les systèmes nerveux (Garg2002) et immunitaire (Kawashima1996)(Sonoda2001)(Anlar2002), et déclencher des rechutes encéphalitiques (Sips2007) :

- L'encéphalite post-éruptive : elle apparaît rapidement (sept à quinze jours après l'apparition des signes cutanés). Il s'agit d'une démyélinisation péri-vasculaire avec infiltration de cellules mononucléées. Une réaction auto-immune est l'hypothèse privilégiée pour expliquer cette démyélinisation. Ce type de complication touche 1/1000 des enfants infectés par la rougeole, surtout chez les plus de deux ans. Elle est mortelle dans 20% des cas (Sips2007).
- L'encéphalite à inclusion rougeoleuse : c'est une complication pour les patients immuno-compromis, en particulier ceux touchés par la leucémie lymphoblastique aiguë (Hughes1993). Elle apparaît entre deux et six mois après l'infection ou la vaccination et est mortelle dans 76% des cas. Les 24% qui survivent, gardent des séquelles neurologiques à vie. La cause de cette encéphalite est la prolifération de cellules gliales, la présence de foyers nécrotiques et une inflammation péri-vasculaire due à une hyperproduction d'anticorps anti virus de la rougeole, bien qu'il s'agisse de patients immunodéprimés. Les analyses par immuno-histochimie montrent un grand nombre d'inclusions nucléaires éosinophiles dans les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones (Sips2007). Les souches sauvages comme vaccinales (Bitnun1999) peuvent provoquer une encéphalite à inclusion rougeoleuse (Hughes1993).

- La sclérose subaiguë panencéphalique (ou encéphalite de Van Bogaert). Selon certaines études, la PESS serait la manifestation d'une encéphalite à inclusion rougeoleuse chez le patient non immunodéprimé (Roos1981). C'est une maladie chronique qui apparaît plusieurs années après, souvent au moment de l'adolescence. Les jeunes garçons sont les plus touchés, avec un *sex-ratio* de 2,5 : 1. Elle est toujours mortelle et peut être très longue, de l'ordre de plusieurs années. L'enfant présente un changement de comportement d'abord difficile à associer à la PESS, puis des pertes d'équilibre. Les troubles évoluent vers la démence puis le coma. La PESS est considérée comme une complication rare : 1/1 000 000 cas en général, mais elle peut en fait atteindre 1/10 000 cas, et est de plus en plus fréquente (Campbell2007). Les neurones infectés présentent des inclusions nucléaires et cytoplasmiques. C'est dans ces inclusions que se réplique le virus. En réponse, les lymphocytes infiltrés produisent une inflammation chronique et diffuse due à la libération d'une grande quantité d'anticorps anti- N, H et F. (Garg2008)(Sips2007)

Le virus de la rougeole et son homologue vaccinal ont été très largement étudiés. Le récepteur cellulaire reconnu par l'Hémagglutinine de la rougeole est la protéine CD150 ou SLAM (pour *Signalling Lymphocytic Activation Molecule*) (Tatsuo2000). C'est une interaction de forte affinité. CD150 est exprimé par de nombreuses cellules immunitaires (notamment les thymocytes immatures, les lymphocytes B et T activés, les lymphocytes T mémoires, les macrophages et les cellules dendritiques matures). Il est constitué de deux domaines immunoglobulines extra-cellulaires : C2 et V. C'est sur ce dernier domaine que se fixe le virus de la rougeole, et ce quelque soit la souche testée (Tatsuo2000)(Yanagi2006).

Comme son autre nom « SLAM » l'indique, CD150 est une protéine de signalisation, ce qui est important à noter pour la suite. L'activation extra-cellulaire de CD150 par un domaine V d'une molécule CD150 autre d'une autre cellule induit le recrutement de la protéine SAP par le domaine SH2 (*Slam Associated Protein*) au niveau intra-cellulaire, activant la voie PKC- $\theta$  / GATA-3. GATA-3 est un facteur de transcription qui dans ce cas, va activer la production des interleukines 4 et 13 (Cocks1995) (Yanagi2006).

Quant à la souche vaccinale, la protéine CD46 est reconnue par le virus en plus de CD150 (Naniche1993). CD46, qui possède aussi une activité de signalisation, est une protéine impliquée dans la régulation du complément, empêchant ce dernier d'attaquer les

cellules humaines. On la trouve donc à la membrane de toutes cellules à l'exception notable les érythrocytes, sous de nombreuses iso-formes (Liszewski1991). CD46 aurait aussi un rôle dans la régulation des lymphocytes T (Marie2002). CD46 possède quatre domaines SRC (*Short Repeat Consensus*). SRC1, et dans une moindre mesure SRC2, permettent l'interaction avec l'Hémagglutinine du virus de la rougeole(Naniche1993)(Lecouturier1996) (Iwata1995).

Alors que tous les virus lient CD150 avec la partie supérieure de la tête globulaire de l'Hémagglutinine (acides aminés D505, D507, R533 et H536) les souches vaccinales lient CD-46 avec la partie latérale (acides aminés, G546, S548 et F549) (Massé2004). Ces deux domaines sont chevauchants au niveau des acides aminés Y524 et T531, et dans une certaine mesure R547. Parmi les changements permettant le passage d'une souche sauvage à une souche vaccinale, on peut noter des mutations dans l'Hémagglutinine S546G, E451V et N481Y. Il a été suggéré que N481 influence la conformation 3D des sites de liaison, et que la double mutation E451V et N481Y est suffisante pour conférer à une Hémagglutinine sauvage les propriétés d'une vaccinale (Lecouturier1996)(Massé2004).

Le virus de la rougeole possède donc deux récepteurs viraux : un récepteur à forte affinité mais présent sur un nombre réduit de cellules (SLAM) et un récepteur de faible affinité mais quasi-ubiquitaire. Les mutations entre les souches sauvages et vaccinales déplacent l'affinité d'un récepteur à l'autre.

Aussi bien SLAM que CD46 ont des homologues chez d'autres animaux, mais seules les protéines de certains simiens peuvent inter-agir avec l'Hémagglutinine du virus de la rougeole. Ainsi, en plus des humains (*Homo sapiens*), le virus de la rougeole peut aussi infecter les chimpanzés (*Pan troglodytes*), certains macaques (*Macaca fascicularis*, *M. radiata*, *M. cyclopis*), certains babouins (*Papio cristatus*), les vervets (*C. aethiops*), les Saimiri communs (*S. sciureus*), certains colobes (*Colobus guereza*), les ouistitis communs (*Callithrix jacchus*), certains sagouins (*Saguinus oedipus* et *S. fuscicollis*) et les singe hiboux (*Aotus trivirgatus*), qu'ils soient ou pas en contacts fréquents avec des humains, mais ne peuvent pas constituer un réservoir ; les populations n'étant pas suffisamment grandes contrairement aux populations humaines (Jones-Engel2006).

Détail intéressant, les érythrocytes de singe possèdent CD46 à leur surface, contrairement à l'homme (Yanagi2006). Ils pourraient donc être utilisés pour tester l'expression et l'affinité pour CD46 des souches vaccinales.

## ***La maladie de Carré***

Le virus de la maladie de Carré (*Canine Distemper virus* en anglais) est un Morbillivirus très proche de celui de la rougeole. La maladie de Carré, du nom du vétérinaire Henri Carré qui l'a caractérisée en 1905, ou maladie du jeune chiot, touche principalement les canidés. Comme pour le virus de la rougeole, le récepteur cellulaire de ce virus est CD150 (Seki2003).

Il infecte d'abord les tissus lymphoïdes, puis le système nerveux. Deux accès possibles sont suspectés pour l'entrée dans le système nerveux : à travers la barrière hémato-encéphalique ou par remontée des neurones du système olfactif. Les symptômes sont très proches de ceux observés lors d'infections humaines par le virus Nipah, avec en plus une inflammation du nerf optique. Le nerf optique est d'ailleurs la région la plus touchée avec la matière blanche du cervelet et des ventricules (surtout le 4<sup>e</sup>) ainsi que la moelle épinière (Sips2007).

Alors que le virus de la rougeole est spécifique des humains (et de certains singes), le virus de la maladie de Carré peut aussi infecter les visons, les furets mais aussi les grand félins (qu'il soient sauvages tels les lions du Serengeti, en Tanzanie, ou en captivité dans des zoos), les chevaux et même les phoques du lac Baïkal en Russie (Appel1995) (Visser1993#95).

En 1988, plusieurs centaines de phoques communs (*Phoca vitulina*) vinrent mourir le long des côtes européennes. L'agent étiologique de cette épidémie était un virus inconnu mais très proche du virus de la maladie de Carré (Harder1990). On a depuis isolé d'autres Morbillivirus de mammifères marins très proches. Ainsi, les marsouins (*Phocoena spp.*) et les dauphins ont eux aussi leurs Morbillivirus respectifs (Sips2007).

## IV-Biologie Moléculaire des Henipavirus

### *IV-1-Structure génétique et séquences codantes des Henipavirus*

Le génome des Henipavirus est un ARN négatif monocaténaire. Il est protégé par un complexe ribo-nucléoprotéique. Voici quelques éléments permettant de comprendre le fonctionnement de ce génome viral : les composantes typiques des Paramyxovirus ainsi que les éléments propres aux Henipavirus.

#### **Taille du génome**

La taille du génome des Henipavirus est le premier caractère à en faire des Paramyxovirus à part. Alors que ces derniers mesurent entre 15 et 16kb, celui des Henipavirus est 20% plus grand. Plus précisément, 18 234 bases pour le virus Hendra, 18 246 bases pour la souche malaisienne du virus Nipah et 6 de plus pour la souche Bengladeshie (Wang2000)(Eaton2006). Ces tailles de génomes sont toutes des multiples de 6. En effet, comme de nombreux Paramyxovirus, les Henipavirus respectent la « règle des 6 »(Halpin2004). Cette règle correspond à la capacité de la protéine N de couvrir 6 nucléotides (Calain1993). Cette association nucléotides-protéines permet une plus grande souplesse physique du génome qui améliore les performances répliquatives, tout en conservant une très grande stabilité, notamment au niveau des liaisons (hydrophobes) entre l'ARN et les protéines N qui ne peuvent être que difficilement détruites. En effet, ces liaisons sont si fortes qu'il faut l'ajout de détergents de type SDS ou de Guanidine HCl 3M pour les détruire *in vitro*. De plus, ce genre de protection de l'ARN lui permet de résister à la nucléase micrococcace et à la RNase A (Kolakofsky1998)(Kolakofsky2005).



## **Mécanique réplivative**

Une fois libéré dans le cytoplasme, le génome ARN négatif est répliqué en ARN positif de deux catégories : les ARN messagers et les anti-génomes. Les premiers vont servir pour la fabrication de protéines virales par la cellule, et les seconds vont permettre de répliquer le génome viral. Cette opération, ainsi que la première réplification, nécessite une ARN polymérase ARN dépendante. Cette polymérase est présente dans le virion, fixé sur le complexe ribo-nucléoprotéique. Pour son bon fonctionnement, cette polymérase reconnaît certaines séquences du génome bien particulières

Le génome des Henipavirus commence par une séquence « *3' leader* » de 55 nucléotides qui agit comme un promoteur des ARN positifs. Comme pour les autres Paramyxovirus, la séquence commence par ACC et deux des trois nucléotides suivants sont des A (ACCGAA).

Une séquence « *5' trailer* » de 33 nucléotides agit comme un promoteur pour les ARN négatifs. Chaque gène viral est séparé par une séquence inter-génique unique et conservée 3'GAA5', la même que celle présente entre la plupart des gènes de Morbillivirus ainsi que des Respirivirus.

Les ARN messagers sont produits selon un gradient résultant d'un phénomène d'atténuation polaire : la polymérase commence par transcrire l'ARN négatif génomique en ARN messager du premier gène et s'arrête à la séquence inter-génique. Deux possibilités sont alors envisageables : le décrochage de la polymérase (qui se raccroche plus tard au niveau de la séquence « *3' leader* ») et la reprise de la transcription au niveau du gène suivant. Dans ce cas, ces mêmes options se représentent au niveau de la séquence inter-génique suivante. Ainsi, les gènes situés du côté 3' du génome sont plus souvent transcrits que ceux situés en 5'. Ce mécanisme d'atténuation polaire se retrouve chez tous les Mononégavirales (Wang2001)

## *IV-2-Les gènes des Henipavirus*

Le génome des Henipavirus est constitué de 6 gènes :

- le gène N qui code la protéine de nucléocapside,
- le gène P qui code plusieurs protéines non structurales ainsi que la phosphoprotéine,
- le gène M qui code la protéine de matrice,
- le gène G qui code la glycoprotéine d'attachement,
- le gène F qui code la protéine de fusion,
- et le gène L qui code la polymérase.

Chaque gène code une seule protéine, exception faite du gène P. Dans ce cas, il existe un site d'édition de l'ARN au niveau du 1325<sup>em</sup> nucléotide (codant le 406<sup>em</sup> acide aminé). L'ajout d'une Guanine à cet endroit par la polymérase décale le cadre de lecture et modifie la fin de la séquence : c'est ainsi qu'est codée la protéine V. Par le même mécanisme, l'ajout de 2 Guanines entraîne l'apparition d'une nouvelle séquence codant une protéine avec nouveau domaine C-term et nommé W. De plus, il existe un deuxième cadre de lecture (+2) à l'intérieur de la séquence codant P. Ce cadre code la protéine C. Dans le gène P, il existe aussi un cadre de lecture appelé SB. Mais l'utilisation de ce cadre n'a jamais pu être vérifiée, et aucune protéine ne lui est associée.

On peut aussi noter que le gène G possède deux codons initiateurs dans le même cadre de lecture. Le premier sert de référence puisqu'il se trouve juste après une séquence inter-génique. Mais il existe un codon Méthionine (ATG) en position 32 du même cadre de lecture et qui se trouve dans un contexte de Kozak favorable. Ainsi, le même cadre de lecture code une glycoprotéine G classique et potentiellement une autre, plus courte en son domaine cytoplasmique de 32 acides aminés. De la même façon, la protéine M pourrait bénéficier de ce phénomène de codon ATG alternatif et avoir des isoformes différentes entre les virus Nipah et Hendra. Seuls quelques acides aminés du domaine N-terminal pourraient ainsi varier, mais l'existence de telles protéines M n'a jamais été prouvée. (Wang2001) (Eaton2006).

## V-Les protéines virales et leurs rôles dans le cycle viral

### *V-1-Le complexe ribo-nucléoprotéique*

La protéine N est une protéine de la nucléocapside. C'est la plus produite lors d'une infection par le virus Nipah ou par le virus Hendra. Elle est longue de 532 acides aminés, pour une masse moléculaire de 58 kDa environ.

Le rôle principal de cette protéine est de se lier à l'ARN viral (d'orientation positive ou négative) ainsi qu'à d'autres protéines N. La structure formée par la polymérisation de N est une spirale à chevrons (plus exactement en os de Herring ou *Herringbone*) de 18nm et d'une période de 5nm. L'ARN se loge dans la structure en spirale, à raison de 6 nucléotides par unité de N. C'est la « règle de Six » discutée précédemment. Ainsi, l'ARN est protégé par cette « colonne vertébrale » protéique. Sa dégradation est limitée, et N permet une meilleure conservation de l'information génétique.

Elle se lie aussi avec des protéines P et L, elles aussi impliquées dans la protection, la réplication et la transcription du génome.

La protéine N ne possède que 20% à 30% de similarité avec les protéines homologues des Paramyxovirus. En revanche, les protéines N du virus Nipah et celle du virus Hendra ont 92% de similarité. Le domaine le plus conservé se trouve entre les acides aminés 171 et 383. C'est à ce niveau que se produisent les interactions avec les protéines P et L.

Chez les Paramyxovirus, il existe une séquence invariante dans la protéine N. Cette séquence (F-X<sub>4</sub>-Y-P-X<sub>3</sub>-S-Y-A-M-G) est retrouvée chez les Henipavirus mais avec une petite variation : la seconde tyrosine est remplacée par une phénylalanine. On retrouve ce changement uniquement chez le virus Nipah et le virus Hendra(Wang2001)(Eaton2006).

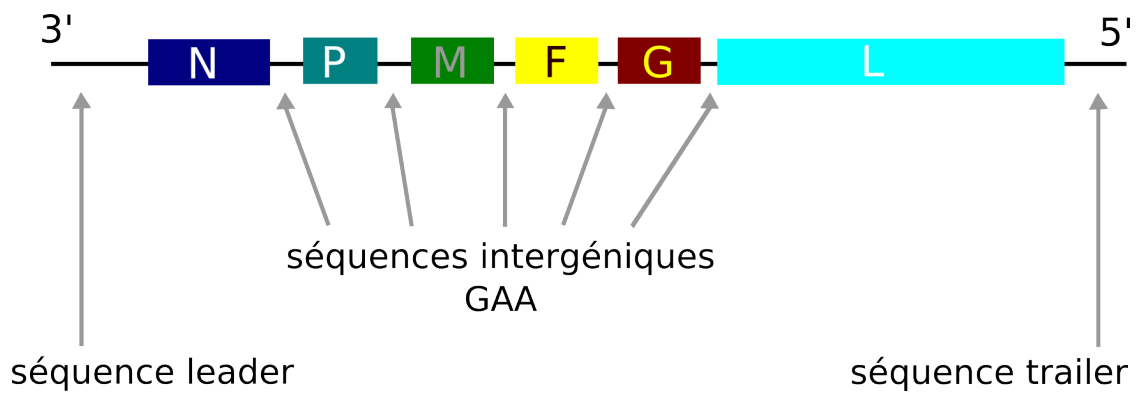


Figure 11 : organisation du génome des Henipavirus

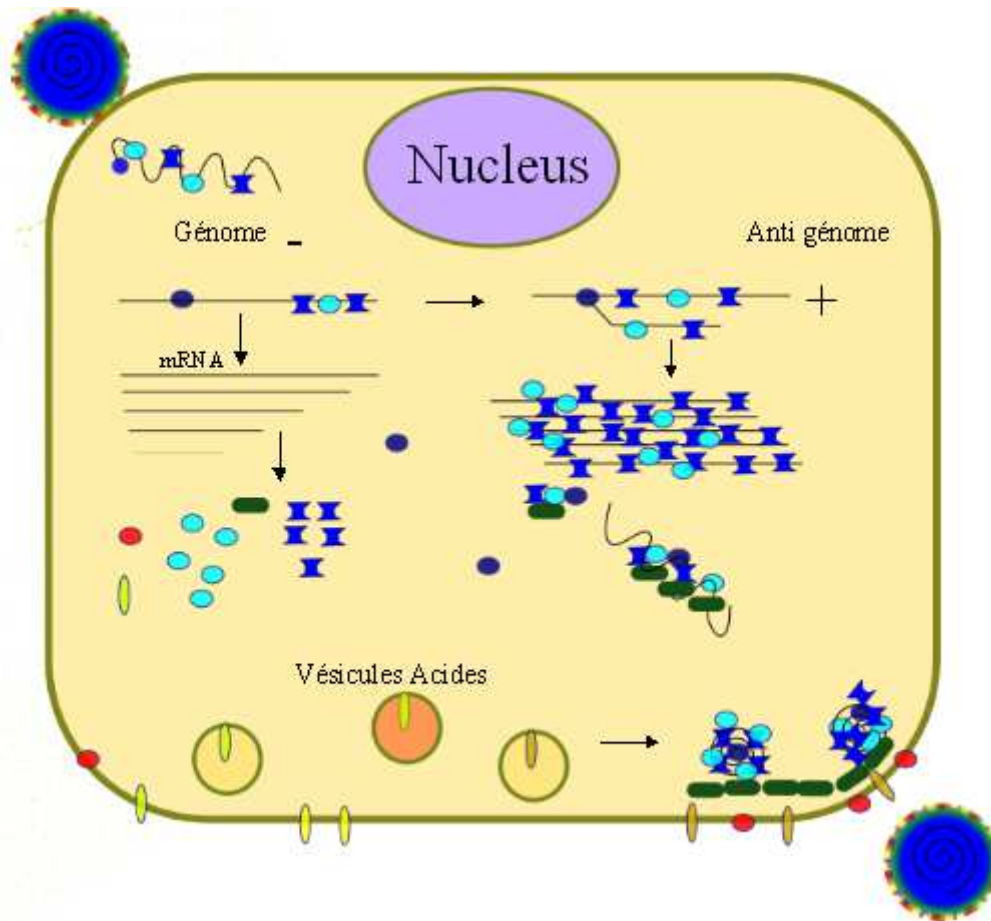


Figure 12 : Le cycle viral. Libéré dans le cytoplasme, le génome est transcrit et répliqué. Les ARN transcrits sont traduits en nouvelles glycoprotéines

La phosphoprotéine P est une protéine de 709 acides aminés (707 pour la phosphoprotéine du virus Hendra), soit une centaine d'acides aminés de plus que les phosphoprotéines des autres Paramyxovirus. Sa masse moléculaire calculée est de 78kDa, mais elle est observée à 98kDa en *western blot*.

Cette phosphoprotéine a pour rôle de stabiliser la structure ribo-nucléoprotéique. On la trouve aussi sous forme d'unités libres dans le cytoplasme. Ses unités libres ont une activité régulatrice de certaines réponses cellulaires qui seront discutées plus loin, au chapitre sur C/V/W.(Wang2001)(Eaton2006)

Le dernier élément de cette ribo-nucléoprotéine est la polymérase L, de 2244 acides aminés soit 257kDa. Un peu plus de 19% de ces acides aminés sont des leucines ou des isoleucines, ce que l'on retrouve chez les autres Paramyxovirus. C'est une ARN polymérase ARN dépendante, elle va donc convertir les ARN génomiques (de polarité négative) en ARN messagers ou en ARN+ (qui serviront d'anti-génomes). Elle peut aussi convertir les anti-génomes en ARN génomiques. Dans le cadre de la fabrication d'ARN messenger, la polymérase des Henipavirus possède sa propre activité coiffante.

De par sa position à l'extrémité 5' du génome, c'est la protéine la moins synthétisée lors de l'infection. Elle est embarquée à l'intérieur du virus grâce à ses affinités pour les protéines N et P. Elle fait donc partie intégrante du complexe ribo-nucléoprotéique.

Les Mononégavirales possèdent une séquence protéique conservée entre tous dans le domaine catalytique de leur polymérase. Une particularité des Henipavirus est d'avoir une mutation dans cette séquence. En effet, la séquence conservée GDNQ y est remplacée par GDNE. Le Paramyxovirus du Tupaia (TPMV), un virus récemment identifié et non classé, mais phylogéniquement situé entre les Morbillivirus et des Henipavirus, possède aussi cette originalité. Sur ce point-là, la séquence catalytique des Henipavirus se rapproche plus de celles des virus à ARN positif qui possèdent deux charges négatives (GDD) (Wang2001)(Eaton2006).

## *V-2-Les protéines non structurales des Henipavirus*

Les produits du gène P sont impliqués dans l'inhibition des réponses cellulaires aux infections. P, ainsi que les protéines C, V et W. De par leur origine ARN commune, P, V et W ont leur domaine N-terminal identique. Ce sont toutes des protéines non structurales.

Le rôle de la protéine C est le moins bien connu de tous. Cette protéine de 166 acides aminés (pour une masse moléculaire d'un peu moins de 20kDa) semble impliquée dans la réplication virale et peut-être dans la réponse immunitaire. Bien que considérée comme non structurale, il est possible de détecter par western blot cette protéine dans les virions de Hendra.(Wang2001)(Eaton2006)

Les rôles des protéines V et W sont plus connus : ces protéines agissent en inhibant la voie des interférons, chacune à son niveau.

La protéine V va agir dans le cytoplasme. Dans le cas du virus Hendra, et comme d'autres protéines homologues de Paramyxovirus (notamment les Rubulavirus des oreillons et parainfluenza 2, ainsi que le respirovirus de Sendai), elle bloque les détecteurs cellulaires RIG-1 et MDA-5. Ainsi, la cellule infectée ne peut plus détecter les ARN bicaténaires, signal d'infection déclenchant la réponse interféron. Dans le cas du virus Nipah, les protéines V bloquent la réponse interféron en se liant aux dimères STAT-1/STAT-2 et en les dirigeant vers la voie de dégradation des complexes de haut poids moléculaire. La réponse aux interférons  $\alpha/\beta$  est donc bloquée. Là encore, c'est un mécanisme très répandu chez les Paramyxovirus, en particulier chez les Rubulavirus (Wang2001)(Eaton2006).

Les unités libres de P, ainsi que les protéines W, agissent de même. En effet, P, V et W ont une action sur la réponse aux interférons  $\alpha/\beta$  parce que ces trois protéines ont un domaine commun recouvrant les 407 premiers acides aminés. C'est ce domaine N-terminal commun aux trois protéines qui possède la séquence de liaison à STAT1 (entre les acides aminés 114 et 140). La simple mutation G121E empêche l'inhibition de STAT1 (Shaw2004)(Shaw2005)(Ciancanelli2009).

De plus, la protéine W a une particularité : elle agit dans le noyau, ce qui est particulièrement étonnant pour un virus à ARN. En effet, la protéine W possède un signal de localisation nucléaire. Cette localisation particulière lui permet d'inhiber les couples STAT1/STAT2 jusqu'au noyau, mais aussi d'inhiber d'autres protéines inaccessibles aux protéines cytoplasmiques P et V. Ainsi, W inhibe les facteurs de transcription IRF3 qui sont nécessaires à la transcription des gènes de la réponse interféron, notamment celui de l'interféron  $\beta$  (Eaton2006).

### *V-3-La protéine de matrice M*

La protéine de matrice M est une protéine longue de 352 acides aminés et d'environ 40kDa. Elle se lie au complexe ribo-nucléoprotéique ainsi qu'à la partie intracellulaire des glycoprotéines de surface (voir plus loin). C'est une protéine dont les propriétés physico-chimiques sont très proches de celles des autres Paramyxovirus :

- Taille et poids comparables (de 341 à 375 acides aminés pour les autres Paramyxovirus)
- Points isoélectriques comparables (9,44 pour le virus Hendra, et 9,99 pour le virus Nipah)
- Charges résiduelles à pH neutre de +14 et +12 (respectivement pour le virus Hendra et le virus Nipah)

Le rôle de la protéine M est de permettre l'association des éléments cytoplasmiques du virus avec ceux de la membrane plasmique. Ainsi, la protéine M contrôle l'assemblage du virus et favorise le bourgeonnement (Wang2001)(Eaton2006). Cette induction du bourgeonnement peut être inhibée en mutant la séquence <sup>62</sup>YMYL<sup>65</sup> de la protéine M du virus Nipah. Les protéines M mutées en Y62A et L65A, ou celles délétées de ce motif sont localisées dans le noyaux et pas à la membrane plasmique (Ciancanelli2006). L'équipe de C. C. Broder a par la suite mis en évidence une autre séquence impliquée dans le bourgeonnement des virus Nipah et Hendra. Il s'agit du motif <sup>92</sup>YPLGVG<sup>97</sup> de la protéine

M : s'il est muté, la production de virions est très fortement inhibée (Patch2008). Cependant, même sans protéine M, il est possible d'obtenir des particules virales, mais en très faible quantité en comparaison à une production associant la protéine M non mutée (Patch2007)

### *V-4-La glycoprotéine de fusion F*

#### **Généralités concernant la glycoprotéine F**

La glycoprotéine de fusion F est une protéine de 546 acides aminés. Il s'agit en fait d'un précurseur, F<sub>0</sub>, ne devenant fonctionnel qu'une fois clivé au niveau du 110<sup>em</sup> acide aminé. De ce clivage sont issus F<sub>1</sub> (436 acides aminés) et F<sub>2</sub> (110 acides aminés). Le clivage est réalisé par la cathepsine L (ce qui est original pour les Paramyxovirus) au niveau du site <sup>104</sup>VGDVK'LAG<sup>112</sup> pour le virus Hendra et <sup>104</sup>VGDVR'LAG<sup>112</sup> pour le virus Nipah (Pager2006). La cathepsine ayant besoin d'un pH acide pour être active, la glycoprotéine F est d'abord exposée à la surface puis ré-intériorisée par endocytose grâce à un domaine d'intériorisation de type YXXΦ situé dans la queue cytoplasmique : <sup>525</sup>YSRL<sup>528</sup>. Les endosomes fusionnent ensuite avec des compartiments acides (endosomes tardifs, lysosomes) où le clivage peut avoir lieu. La glycoprotéine F clivée est ensuite renvoyée à la surface (Vogt2005)(Diederich2005).

Malgré le clivage par la cathepsine L, les sous unités F1 et F2 restent covalamment liées grâce à un pont di-sulfure au niveau de la cystéine 190. La glycoprotéine F possède d'autres ponts di-sulfures, notamment dans la partie F1, entre les acides aminés 425 et 300. Cette région riche en cystéine compte 4 ponts di-sulfures (5 pour le virus Hendra) qui forment de petites boucles de quelques acides aminés (entre 8 et 26 selon les boucles) et structurent cette partie de la protéine pauvre en hélice α ou en feuillet β. Ces boucles sont conservées entre les virus Nipah et Hendra, bien que les ponts puissent légèrement varier d'un virus à l'autre. C'est aussi au niveau de cette zone que vient se loger F<sub>2</sub> (Bossart2005) (Eaton2006)

La glycoprotéine F présente d'autres modifications post-traductionnelles. Comme son nom l'indique, elle possède plusieurs sites de glycosylation potentielle : trois sur F1 et trois autres sur F2. Ces glycosylations permettent une plus grande discrétion



antigénique vis-à-vis des anticorps neutralisants du système immunitaire, mais pénalisent l'activité de fusion de membrane (Aguilar2006)(Wang2001)

Après le clivage, la partie N-terminale de F<sub>1</sub> nouvellement créée se révèle être très hydrophobe. Il s'agit d'un peptide de fusion dont la séquence est très conservée. Cependant, le premier acide aminé est une leucine, alors que les peptides de fusion de tous les autres Paramyxovirus commencent par une phénylalanine (sauf quelques souches non virulentes de virus de Newcastle) (Wang2001).

La partie F1 contient deux domaines à répétition heptadique (HR). Il s'agit de motifs de sept acides aminés dont les 3<sup>em</sup> et 7<sup>em</sup> acides aminés sont soit une leucine, soit une isoleucine soit une valine (et pour un cas seulement, une méthionine). La structure en hélice  $\alpha$  renvoie ces acides aminés vers l'extérieur, les uns à côté des autres et les deux hélices inter-agissent par ces résidus exposés. La première hélice  $\alpha$  se trouve entre les acides aminés 125 et 209 (HR1), la seconde entre les acides aminés 449 et 485 (HR2), juste avant le domaine trans-membranaire. Ces hélices et leur interaction permettent les changements de conformation lorsque la glycoprotéine F est activée.(Bossart2005)(Wang2001)

Ces motifs HR peuvent être une cible anti-virale. En effet, il est possible de bloquer les changements de conformation de la glycoprotéine F avec des peptides reproduisant partiellement ces domaines HR (Bossart2005)(Bossart2007). Une telle stratégie est déjà utilisée contre le virus de l'immuno-déficience humaine (VIH) et utilisée en thérapie sous le nom de Fuzeon ou T20 (Kilby1998)(Kilby2002). Cependant, l'infection de cellules Vero par les virus Nipah ou Hendra en présence de ces peptides ne bloque pas l'entrée du virus dans les cellules. Leur efficacité est pourtant bien réelle, car même si le virus pénètre dans les cellules, il est incapable de provoquer la formation de syncytia. C'est un résultat surprenant : il suggère que le virus n'entre pas en utilisant la glycoprotéine F, mais qu'elle est nécessaire pour la formation de syncytia. Cependant, les auteurs n'ont pas étudié de plus près ce paradoxe, peut-être leur a-t-il échappé ? (Bossart2005)

Pour finir, les glycoprotéines F s'oligomérisent une fois maturées et exposées, agissant en trimères, comme tous les Paramyxovirus connus (Baker1999).

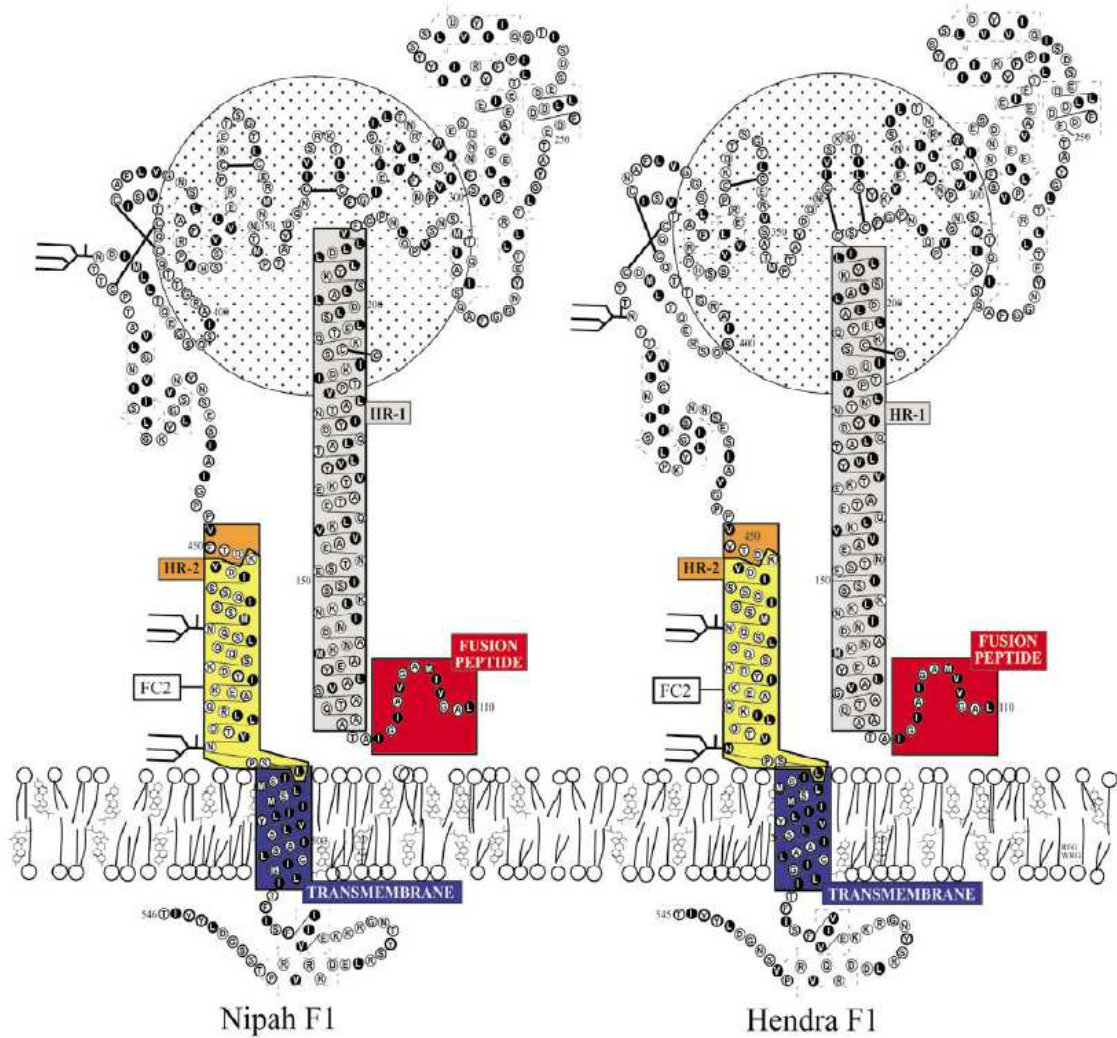


Figure 13 : Structure des glycoprotéines F1 des Hénipavirus (d'après Bossart et al, 2005 – Creative Commons)

## ***La chloroquine, inhibiteur de la maturation de F***

La cathepsine L est un facteur limitant dans la production de glycoprotéine F fonctionnelle, et donc de virus infectieux. La cathepsine L est une enzyme de clivage dont l'activité dépend du pH acide du compartiment dans lequel elle se trouve. Ce pH devant être acide, on la retrouve active dans les endosomes tardifs et les lysosomes(Pager2006)

La Chloroquine (ou *N'*-(7-chloroquinolin-4-yl)-*N,N*-diethyl-pentane-1,4-diamine, vendu sous le nom de Nivaquine) est une molécule découverte et synthétisée par Hans Andersag en 1934. C'est une base légère qui pénètre dans les cellules sous forme non protonée. Elle permet la neutralisation des compartiments cellulaires acides avec une efficacité inversement proportionnelle au pH, selon la loi de Henderson-Hasselbach (Rolain2007).

La Chloroquine est d'abord utilisée contre le paludisme (en traitement préventif comme en curatif), comme substitut à la quinine, et ce depuis les années 1940. Elle est depuis devenue la molécule la plus utilisée contre les infections dues aux parasites *Plasmodium* (*P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale* et *P.falciparum*) responsables du paludisme, et ce, partout dans le monde (Rolain2007). Dans le cas des *Plasmodium*, c'est dans les vésicules digestives (compartiments acides) que la Chloroquine s'accumule, y augmentant le pH. Elle perturbe ainsi le métabolisme du parasite. Cependant, les cas de *Plasmodium* résistant à la Chloroquine sont de plus en plus nombreux (exception faite pour *P.vivax*) notamment grâce aux protéines PfMDR1 et PfMDR2. Une simple mutation K76T sur une autre protéine, appelée PfCRT, permet un rejet de la Chloroquine hors de la vésicule digestive et confère au *P.falciparum* une relative tolérance, voire une résistance totale (selon les souches), à la Chloroquine (Fidock2008).

La Chloroquine est aussi utilisée depuis longtemps pour d'autres maladies, notamment celles impliquant les compartiments acides tels la polyarthrite rhumatoïde (Freedman1960) et le lupus (Goldman1953).

De plus, de nombreuses bactéries et champignons intracellulaires utilisent les vésicules acides de leur hôte. L'efficacité de la Chloroquine contre ces infections a déjà été

prouvée pour les bactéries intracellulaires *Coxiella burnetii in vivo*, *Brucella abortus*, *Legionella pneumophillia*, *Mycobacterium tuberculosis* et plusieurs autres *in vitro*. Pour les champignons, la Chloroquine inhibe *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* et *Cryptococcus neoformans in vivo* (voir la revue par Rolain *et al.*, 2007)

La Chloroquine est aussi utilisée dans le cadre d'autres maladies, sans lien particulier avec les compartiments acides, tels les glioblastomes et plus généralement les cancers. Les propriétés intercalantes sur l'ADN de la Chloroquine lui permettent en effet de rendre plus sensibles les cellules néoplasiques aux traitements chimio- et radiothérapeutiques(Munshi2009).

Mais en augmentant le pH des compartiments acides, la Chloroquine peut être utilisée comme un antiviral. De nombreux virus ont en effet besoin de ces compartiments pour la maturation de leurs protéines. Cette propriété a déjà été prouvée *in vitro* pour de nombreux virus tels le VIH, celui du Chikungunya, du Coronavirus du SRAS, de plusieurs hépatites, et bien d'autres (Rolain2007).

En augmentant le pH des vésicules acides, il est possible de bloquer la production de glycoprotéines F fonctionnelles. Nous avons pu montrer que cette stratégie permettait de bloquer l'infection *in vitro* du virus Nipah (Eserink dans Science 2009, copie en Annexe) ; détails dans la partie résultats) et Hendra (non publiés, détails dans la partie résultats). Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe utilisant un système de pseudotypes viraux (Porotto2009). Cependant, des tests sur des furets (un modèle animal qui est loin d'être optimal) ont montré une inefficacité de la Chloroquine à faibles doses *in vivo*. Selon mes résultats, les doses nécessaires sont très élevées (voir la partie « Résultats »).

Mais l'utilisation de la Chloroquine n'est pas sans danger. A long terme, elle cause de graves problèmes ophtalmologiques (Portnoy1983). A fortes doses (plus de 5 grammes en une seule prise induisant une concentration sanguine d'environ 25 $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>) c'est un médicament hypokaliémant, hypotenseur (systoles à moins de 80 mm Hg) et cardiotoxique (Clemessy1996)(White2007). Les effets négatifs des surdosages de Chloroquine sont bien connus depuis les années 1980-1990. La publication en 1982 d'un livre incitant au suicide (Guillon et Le Bonniec, 1982), et recommandant l'utilisation de Chloroquine pour se faire, entraîna une série de tentatives (Meeran1993) .

La prise en charge médicalisée de nombreux de ces cas a permis de constater que la combinaison avec de fortes doses de Diazepam (sous forme de Valium) favorisait le pronostic. L'utilisation de Diazepam en combinaison avec la Chloroquine permettrait d'augmenter les doses (Clemessy1996). L'épinéphrine permet aussi d'augmenter les chances de survie lors de surdosage, de même que le thiopental (originellement utilisé lors des intubations endo-trachéales des patients en surdosage) qui améliore de plus de 90% les chances de survie lors d'une ingestion d'une dose mortelle (Riou1988)(Clemessy1996). Ces combinaisons nécessitent tout de même un cadre et un suivi médical au niveau de la ventilation, mais ont permis la survie de patients ayant ingéré 12g en une seule prise (concentration sanguine de  $25\mu\text{M}$ ) et même la survie d'un patient dont la concentration sanguine était de  $90\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Clemessy1996)

Une autre alternative est l'utilisation de l'analogue Hydroxychloroquine (vendu sous le nom de Plaquenil ou Quineprox). Cet analogue est utilisé dans le traitement et la prévention du paludisme, notamment chez les enfants. Il est moins toxique et aussi efficace (Clemessy1996) ; non publiés, détails dans la partie résultats). Bien sur, le surdosage est toujours possible. Mais une personne ayant ingéré 22g en une seule prise a survécu après avoir été prise en charge au Centre hospitalier universitaire d'Izmir en Turquie, et ce sans utilisation de Diazepam. Après quelques jours de convalescence, elle est repartie sans aucune séquelle (Yanturali2004)

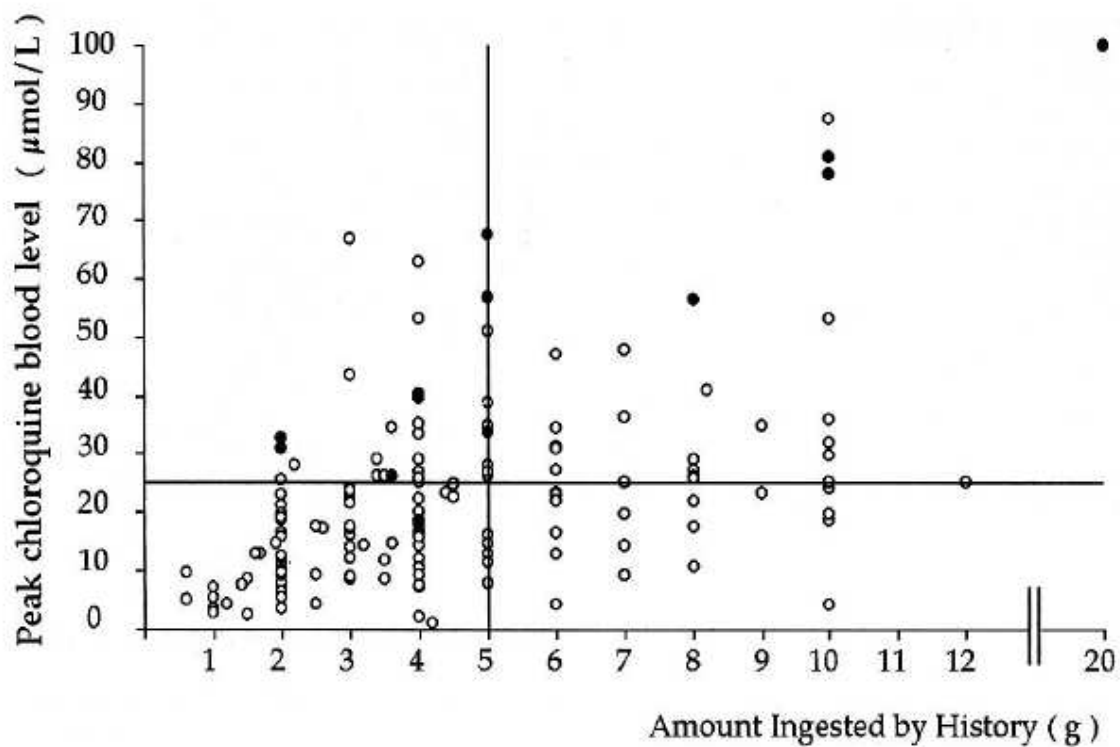


Figure 14 : Concentration sanguine en chloroquine en fonction de la quantité ingéré per os lors de l'étude de Clemessy et al, 1996. Les survivants sont représentés par des cercles vides, les cas fatals par des cercles pleins (Clemessy1996).

## *V-5-La glycoprotéine d'attachement G*

La glycoprotéine d'attachement G est longue de 604 acides aminés pour le virus Hendra, et 602 pour le virus Nipah (Wang2001). Elle est composée de quatre parties :

- Une queue cytoplasmique constituée des 50 premiers acides aminés (ou moins, selon le codon Methionine de départ)
- Un domaine transmembranaire unique des 23 acides aminés suivants
- Une «tige» (entre les acides aminés 83 et 182), conservée entre les virus Nipah et Hendra.
- au sommet du domaine extra-cellulaire de la tige, une tête globulaire (entre les acides aminés 183 et 602).

C'est à la surface de cette tête globulaire que se trouve le domaine d'interaction avec le récepteur des virus Nipah et Hendra. Cette tête globulaire se présente sous forme de six feuillets  $\beta$  organisés en clef grecque et enroulés en hélice. Elle ressemble énormément à la plupart des protéines d'attachement des Morbillivirus, en particulier l'Hémagglutinine du virus de la rougeole, ainsi qu'avec la glycoprotéine HN des respirovirus. L'attachement au récepteur se fait grâce à un canyon hydrophobe au centre de l'hélice, bordé par les acides aminés E533 et Y504, qui sera détaillé plus loin (Bowden2008)(Guillaume2006).

Comme indiqué plus haut, l'homologue fonctionnel de G chez le virus de la rougeole est la glycoprotéine H. Mais la glycoprotéine G des Henipavirus ne possède pas d'activité hémagglutinante comme les souches vaccinales de Morbillivirus, et contrairement aux autres Paramyxovirus elle ne possède pas non plus d'activité neuraminidase bien que sa structure en 3 dimensions soit conservée avec les neuraminidases virales, bactériennes et eucaryotiques (Wang2001).

Les Glycoprotéines G des Hénipavirus possèdent 8 sites de glycosylation potentiels, dont 5 sont utilisés (Asn 306, 378, 417 481 et 529). Elles possèdent aussi 7 ponts di-sulfures, les même que ceux observés sur la glycoprotéine HN des respirovirus. A la surface du virus, elles sont retrouvées oligomérisées grâce ses hélice  $\beta 1$  et  $\beta 6$ , principalement sous forme de tétramères et associées aux trimères de glycoprotéines F (Wang2001)(Bowden2008)

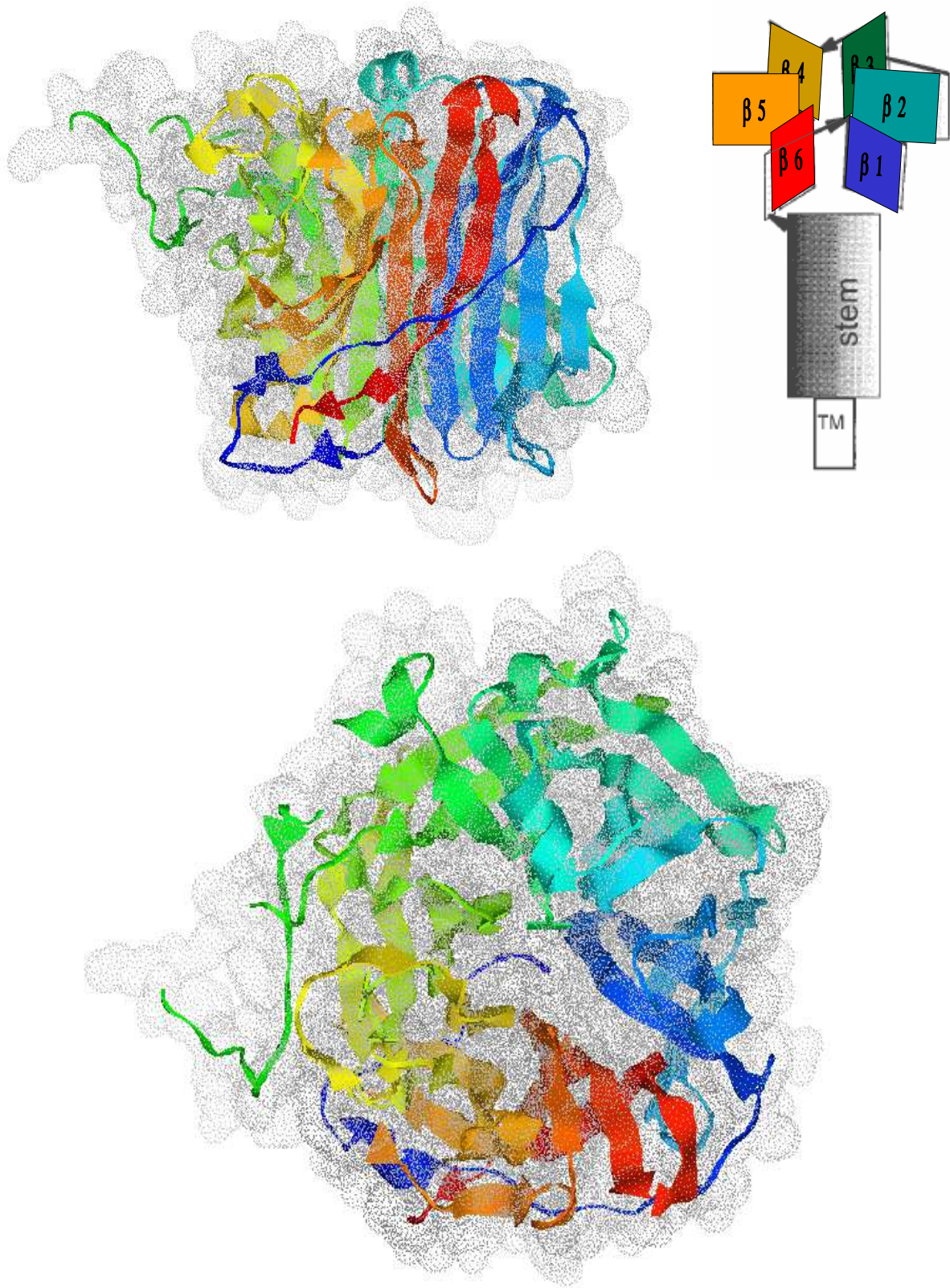


Figure 15 : Vues de côté (en haut à gauche) et de dessus (en bas) de la tête globulaire de la glycoprotéine G du virus Nipah. Schéma de la protéine dans son ensemble (en haut à droite). PDB par JPM Langedijk (Guillaume2006)



## VI-Le récepteur cellulaire des Hénipavirus : l'éphrineB2

### *VI-1-Généralités*

L'éphrineB2 est une protéine trans-membranaire de 333 acides aminés appartenant à la famille des Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK). Elle permet la transmission de signaux bidirectionnels, c'est à dire qu'elle est à la fois ligand et récepteur. Ses molécules partenaires sont principalement l'EphB4 et l'EphB2, parfois l'EphB1. Concernant la nomenclature, on parle de récepteur Eph et de ligand éphrine, bien que l'un et l'autre soient à la fois récepteur et ligand (Holmberg2002)(Kobayashi2007).

L'éphrineB2 est une protéine très importante lors du développement précoce, principalement au moment de la neurogénèse et de l'angiogénèse. On la trouve aussi associée au système immunitaire. D'une manière générale, c'est une molécule clef du chémotactisme et de la motilité cellulaire.

En 2005, l'équipe de Benhur Lee a démontré que l'éphrineB2 était le récepteur du virus Nipah (Negrete2005) Ces résultats ont été confirmés la même année par l'équipe de Christopher C. Broder qui a démontré que l'éphrineB2 est aussi le récepteur du virus Hendra (Bonaparte2005). De plus l'éphrineB3, une protéine dérivée de l'éphrineB2, peut aussi servir de récepteur mais de moindre affinité (Negrete2005)

L'éphrineB2 est excessivement conservée au cours de l'évolution. L'éphrineB2 murine est très proche de l'éphrineB2 humaine, les deux séquences d'acides aminés étant identiques à plus de 97% (les quelques différences entre ces deux protéines pourraient expliquer la résistance des cellules murines face à l'entrée des Henipavirus). Il est donc très difficile de fabriquer un anticorps efficace contre l'éphrineB2. Pour détecter l'expression de l'éphrineB2, il est plus facile d'utiliser une protéine recombinante EphB4-Fc (Füller2003)

## ***VI-2-Le rôle de l'éphrineB2 dans l'angiogénèse***

### ***Fonction de l'éphrineB2***

L'un des grands rôles de l'éphrineB2 est la mise en place des cellules endothéliales. L'éphrineB2 permet aux précurseurs des cellules endothéliales de trouver leur place dans le système vasculaire en formation en jouant le rôle de ligand de EphB4. EphB4 est présent exclusivement sur les cellules veineuses, et éphrineB2 sur les cellules artérielles. La suppression du gène de l'éphrineB2 (*EFN B2*) empêche la formation correcte d'un système veine-artère chez ces animaux transgéniques. En bref, le couple éphrineB2-EphB4 va permettre la différenciation entre les deux types cellulaires et la mise en place des jonctions artérioles-veinules (Wang1998)(Korff2008).

Il existe, lors de la formation de masse tumorale, un mécanisme d'angiogénèse pouvant emprunter certains éléments moléculaires inactivés depuis la fin de l'angiogénèse embryonnaire. En effet, la tumeur a besoin d'oxygène et de nutriments. Le manque de ces éléments vitaux lors de la croissance tumorale peut déclencher des mécanismes d'angiogénèse. Ainsi, l'éphrineB2 a récemment été associée à de nombreuses formations tumorales et cancers : cancer colorectal (Liu2004), sarcome de Kaposi (Masood2005), cancer du sein (Kumar2006), cancer col de l'utérus (Alam2007)(Alam2009), cancer des ovaires (Alam2008), myélome (Pennisi2009) et la liste devrait s'allonger encore dans les mois à venir. Pour les même raisons, on retrouve l'éphrineB2 exprimée dans de très nombreuses lignées cellulaires (Vero, BHK, HeLa...), ce qui les rend très permissives aux Henipavirus.

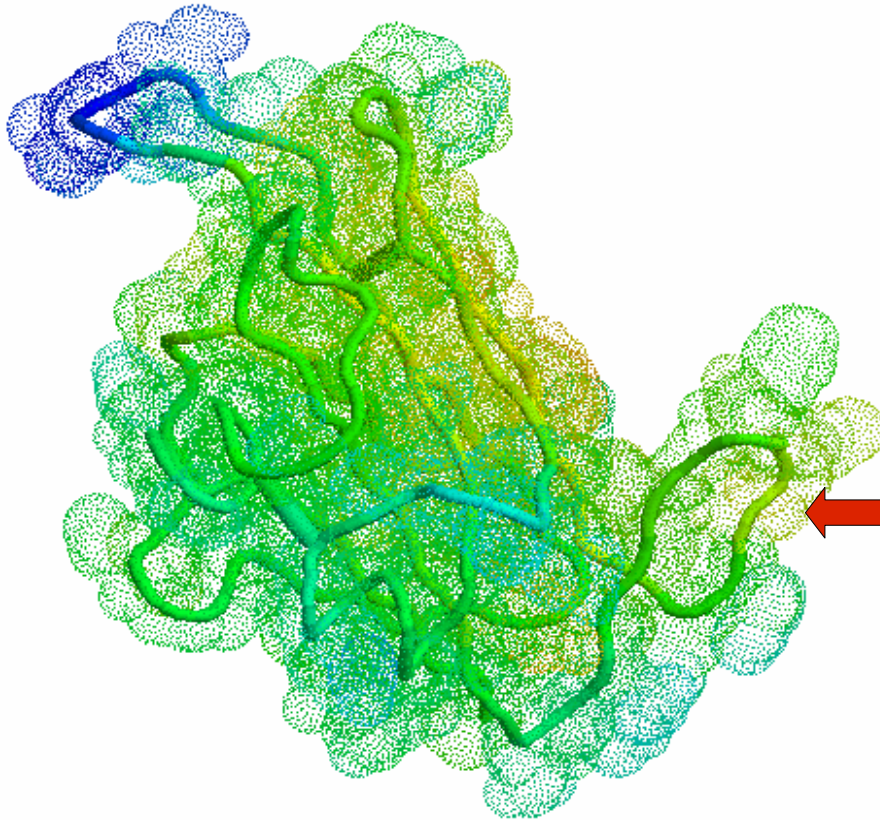


Figure 16 : Domaine extra-cellulaire de l'éphrineB2. Complètement à droite, la boucle G-H (flèche rouge) (Code PBD : 1KGY)

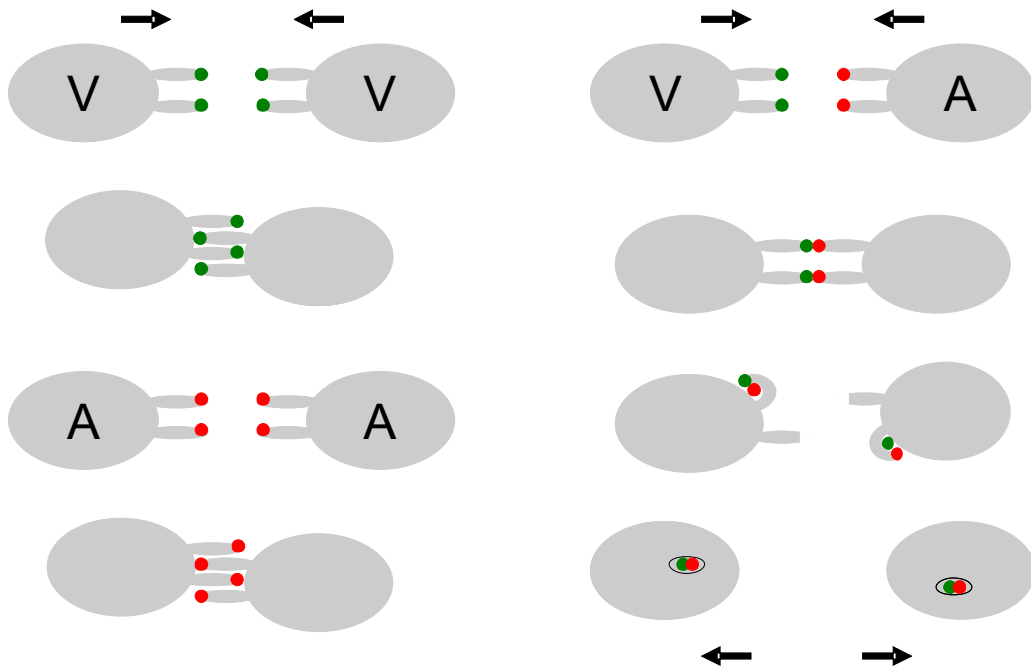


Figure 17 : mécanisme d'adhésion (à gauche) et de répulsion (à droite) des cellules endothéliales exprimant éphrineB2 (points rouges) ou EphB4 (points verts)(Source : R.obin Buckland, d'après Wilkinson et al., 2003)

### ***Exemple des interactions entre éphrineB2 et EphB4***

L'interaction éphrineB2-récepteur est de très forte affinité grâce à une boucle (dite boucle G-H) entre les acides aminés 120 et 125 (Chrencik2006). Des études concernant les interactions entre l'éphrineB2 et l'EphB4 montrent que lorsque ces deux protéines exprimées par deux cellules différentes se rencontrent, chacune émet un signal par sa queue cytoplasmique. Dans le cas d'une cellule exprimant éphrineB2, ce signal va induire la phosphorylation de certaines tyrosines de la queue cytoplasmique, et notamment la tyrosine 304 (Su2004). Ces tyrosines phosphorylées sont reconnues par la protéine (à domaines SH2 et SH3) Grb4 (Cowan2001) qui va transduire le signal via une cascade de phosphorylation, et ce jusqu'à déclencher des reflux de membrane et un désassemblage du cytosquelette induit par l'activation de Rac1 (Marston2003)(Wilkinson2003). Les reflux membranaires vont à l'encontre des liaisons très fortes entre EphB4 et éphrineB2, et provoquent la co-endocytose de ces molécules. L'internalisation de l'une entraîne l'internalisation de l'autre et donc l'arrachage d'un bout de la membrane de la cellule opposante. Les deux cellules se désolidarisent. De cette façon l'interaction des domaines extra-cellulaires entraîne la répulsion des deux cellules. Si au contraire les deux cellules expriment l'éphrineB2 (ou l'EphB4), elles adhèrent (Wilkinson2003).

Ce mécanisme permet aussi bien une ségrégation entre veine et artère que le développement axonal (Zimmer2003)

### ***VI-3-Le rôle de l'éphrineB2 dans la neurogénèse***

L'autre grand rôle de l'éphrineB2 dans le développement précoce est la mise en place et l'organisation du système nerveux. Elle permet à une cellule nerveuse d'analyser son environnement, et de se déplacer en fonction de celui-ci. Elle est la protéine clef d'un chimiotactisme lié à la composition des membranes cellulaires environnantes. La présence d'une protéine « attractive » ou « répulsive » sur une cellule environnant une cellule exprimant l'éphrineB2 va déterminer sa migration. Parmi les protéines influant sur les cellules exprimant l'éphrineB2 dans le cerveau en développement, on peut noter l'EphB2 et

l'EphB1 (Zimmer2003)(Kobayashi2007).

De plus, l'expression d'éphrineB2 par une cellule induit la production de très longs et très ramifiés filopodes qui ne sont pas sans rappeler axones et dendrites (Meyer2005)(Pernet2009). La production de ces prolongements semble directement liée à la motilité cellulaire (Meyer2005) .

#### ***VI-4-Autres rôles de l'éphrineB2 : systèmes immunitaire, osseux***

Comme nous l'avons vu précédemment, l'EphB4 est le récepteur principal de l'éphrineB2. Ce récepteur est exprimé par les monocytes. Les monocytes reconnaissent donc les cellules exprimant l'éphrineB2, et cette interaction leur permet de s'accrocher et de traverser les endothéliums artériels. La partie extra-cellulaire de l'éphrineB2 permet l'attachement, et la partie intra-cellulaire permet la migration. Les cellules exprimant une protéine éphrineB2 délétée de sa partie intra-cellulaire ne permet plus la migration des monocytes, mais simplement leur attachement. Le rôle du domaine cytoplasmique et donc de la transmission du signal est encore une fois prédominant dans cette autre fonction de l'éphrineB2(Pfaff2008).

L'éphrineB2 est aussi impliquée dans les interactions entre les ostéoclastes et les ostéoblastes. Ces deux types cellulaires interviennent dans la régulation de la croissance des os. Les ostéoclastes sont issus des cellules souches hématopoïétiques. Une fois leur différenciation en ostéoclaste terminée, ce sont des cellules plurinucléées, présentant un fort reflux membranaire, sécrétant des enzymes protéolytiques (par exemple la Cathepsine K) ainsi que de l'acide chlorhydrique. Leur rôle est de limiter la prolifération osseuse due aux ostéoblastes. Ceux-ci dérivent des cellules souche mésenchymateuses. Leur rôle est de former de nouveaux os et de limiter la prolifération des ostéoclastes.

L'association et la prolifération de ces deux types de cellules doivent être parfaitement régulées pour qu'il n'y ait pas de formation ou de destruction massive d'os. La communication entre ces deux types cellulaires est régulée par l'éphrineB2 (exprimée par les ostéoclastes) et l'EphB4 (exprimée par les ostéoblastes).

L'éphrineB2 est exprimée par les ostéoclastes à partir de leur différenciation (étape mononucléées). Dès lors, les contacts avec les ostéoblastes et leurs protéines EphB4 va

activer le domaine PDZ des protéines éphrineB2, et ce signal va bloquer la prolifération des ostéoclastes, les empêchant ainsi de détruire trop de structure osseuse (Edwards2008)| (Zhao2006).

Appareil vestibulaire : l'éphrineB2 est aussi retrouvée dans l'épithélium de l'appareil vestibulaire. Sa présence influence les concentrations en électrolytes de l'endolymphe vestibulaire. Les souris déficientes pour la fonction réceptrice d'éphrineB2 présente ainsi de graves troubles de l'équilibre et de la démarche (Dravis2007).

## VII-L'entrée et la dispersion des Henipavirus dans l'organisme

### *VII-1-L'entrée*

Les Henipavirus entrent dans l'organisme lors de contact rapprochés : lors des épidémies australiennes et malaisiennes, seules les personnes ayant eu des contacts avec des animaux infectés ont développé la maladie. Avec les épidémies du Bangladesh et l'apparition de transmissions directes entre les chauves-souris et les hommes, les contacts ne semblaient plus nécessaires. Dès lors, deux types de contaminations étaient observés :

- Une transmission inter-humaine par contact, correspondant aux transmissions cheval-homme ou porc-homme lors des précédentes épidémies
- Une transmission de la chauve-souris à l'homme qui ne nécessite pas de contact entre l'animal infecté et l'homme.

Lors de ce deuxième type d'infection, le virus transite par l'alimentation : les chauves-souris frugivores (pour qui l'infection est bénigne) mangent partiellement les fruits et les laissent tomber à terre où ils seront récupérés pour l'alimentation humaine (ou pour celle des porcs). Les Henipavirus sont présent en grandes quantités dans les fluides biologiques des chauves-souris, surtout dans la salive et l'urine. Les fruits souillés consommés par les humains, en particulier les enfants, peuvent ainsi déclencher une épidémie qui se propagera ensuite par contacts rapprochés.

Au Bangladesh, les zones de contamination sont souvent proches de plantations de palmiers dattiers (*Phoenix sylvestri*). Cet arbre est cultivé pour son lait, notamment utilisé pour l'alimentation humaine. Le prélèvement du lait se fait comme pour le caoutchouc : une saignée est creusée dans le tronc et de cette saignée s'écoule le lait que l'on peut récupérer dans un pot. Mais les chauves-souris viennent la nuit boire les récoltes et souvent urinent dans les pots de collection (parfois même s'y noient) contaminant ainsi le lait. Ce même lait sera ensuite vendu le lendemain matin, de village en village, pouvant lancer ainsi plusieurs foyers d'épidémie (Luby2006)(Luby2009).

Ce sont les chauves-souris du genre *Pteropus* qui ont été les premières à être testées positives aux Henipavirus. Leur capacité à transmettre le virus varie selon plusieurs paramètres. Une étude réalisée sur les *Ptéropus leyli* de Thaïlande montre par exemple que c'est entre les mois de Mai et de Juillet que les chauves-souris secrètent le plus de virus (Wacharapluesadee2009). Au Bangladesh, les données épidémiologiques montrent que la plupart des contaminations inter-espèces ont lieu en début d'année civile (de Février à Mai) (Luby2009).

## ***VII-2-Dispersion***

Pour l'instant, aucune étude ne permet de dire définitivement quel tissu est le premier touché. Mais on sait que le virus a besoin de cellules exprimant le récepteur viral (l'éphrineB2, l'éphrineB3 ou peut-être un autre récepteur inconnu à ce jour) ainsi que la cathepsine L.

Une fois infectées, les cellules forment des syncytia avec les cellules voisines, ce qui permet une localisation facile de l'infection. Sans surprise, les tissus touchés sont ceux qui expriment fortement les récepteurs viraux éphrineB2 ou éphrineB3.

Les jonctions artério-veineuses sont donc très touchées : l'endothélium est à cet endroit très riche en éphrineB2 et les virus y induisent facilement des syncytia, provoquant la vascularite caractéristique des Henipavirus. Les poumons, riches en capillaires peuvent être aussi fortement touchés, ainsi que le cerveau, autre grand concentrateur de capillaires. De plus, la formation de syncytia dans cette partie du système vasculaire contribue à la destruction de la barrière hémato-encéphalique, facilitant aux virus l'accès au cerveau, riche en éphrine et en particulier en éphrineB3. On observe ainsi un grand nombre de syncytia, nécroses et inclusions virales au niveau du système nerveux. Le bulbe olfactif n'est jamais touché, ce qui semble indiquer que le virus ne pénètre pas dans le cerveau par cette voie mais bien par les lésions dues à la vascularite (Wong2002).

## **VIII-Diagnostic et Traitements**

### ***VIII-1-Diagnostic***

#### ***Diagnostic en Imagerie par Résonance Magnétique***

Lors des premières apparitions du virus de Nipah, les symptômes furent d'abord interprétés comme ceux de l'encéphalite Japonaise. La réponse sanitaire fut donc inappropriée. Il n'est donc pas étonnant que les premières méthodes de diagnostic publiées permettent de différencier le virus Nipah des autres virus responsables d'encéphalite. Ainsi, seulement 2 ans après l'épidémie de virus Nipah, l'Institut National des Neurosciences de Singapour recommandait l'utilisation de l'IRM pour discriminer les encéphalites dues aux virus Nipah des autres (Lim2000). Indépendamment, cette méthode fut aussi proposée par l'Université de Malaya à Kuala Lumpur (Malaisie) (Sarji2000).



## ***Diagnostic sérologique et biologie moléculaire***

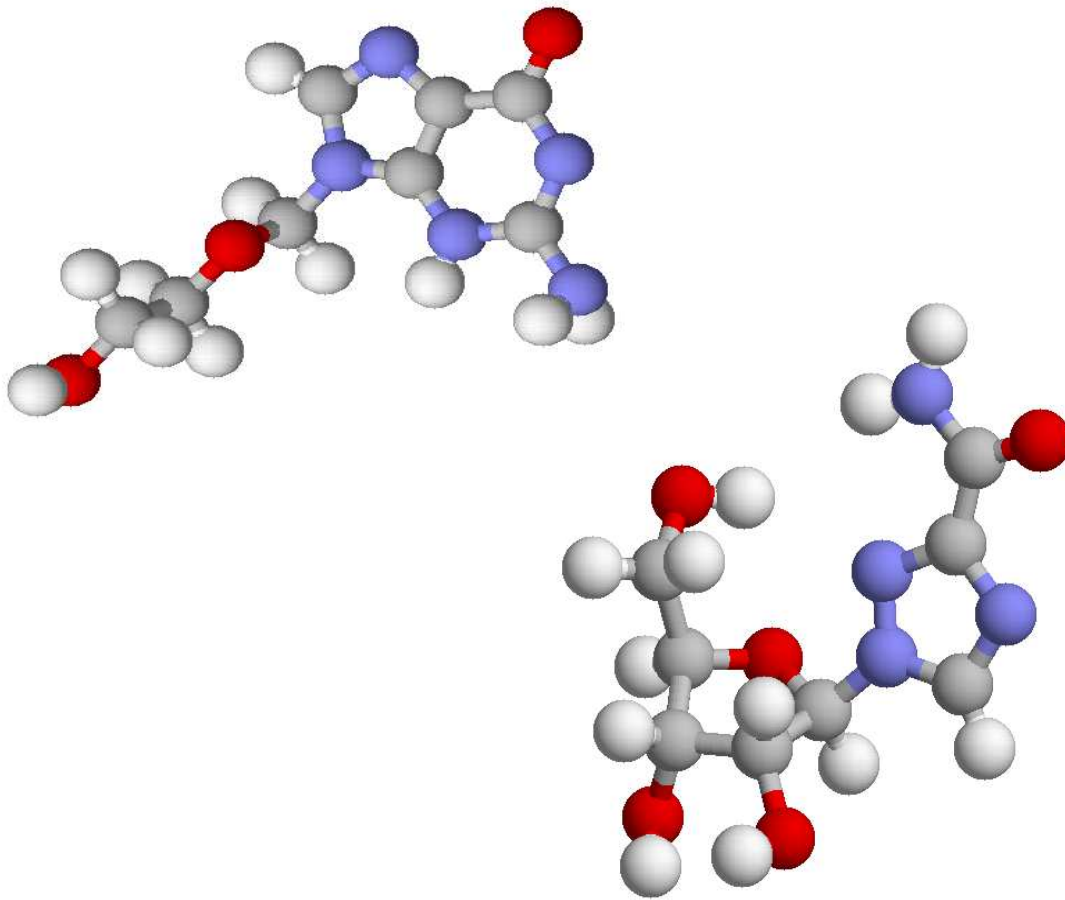
L'année suivante, le premier protocole pour une détection rapide des virus Nipah et Hendra, ou d'anticorps anti-Henipavirus, est publié. Les méthodes utilisées combinent ELISA et marquage anti-Phosphoprotéine sur des syncytia (Cramer2002) Le procédé a depuis été largement amélioré, notamment avec l'utilisation de protéines virales purifiées (Eshaghi2005)

En 2004, Guillaume *et al.* publient le premier test spécifique utilisant un protocole de RT-PCR TaqMan (Guillaume2004) L'amplification est réalisée sur l'ARN codant la nucléoprotéine. Cet ARN est le plus présent dans les cellules infectées à cause des phénomènes d'atténuation polaire.

### ***VIII-2-Les tentatives de traitements thérapeutiques***

Il n'existe actuellement pas de traitement thérapeutique des Hénipavirus. Cependant, au cours des épidémies et des travaux de recherche, plusieurs molécules ont été testées :

- Propofol / Midazolam : l'utilisation de ces anesthésiants avait pour but de calmer les symptômes. Cette combinaison n'a été testée que sur un seul patient, sans succès thérapeutique.
- Acyclovir : l'acyclovir est un analogue nucléosidique. Antiviral à spectre restreint il est très efficace contre certains Herpesviridae (des virus à ADN). Il a été testé de façon empirique lors de l'épidémie de Malaisie, mais le seul patient traité est mort.
- Ribavirine : antiviral à large spectre, la Ribavirine est connue pour être efficace contre les virus à ARN. Une étude sur près de 200 personnes (140 patients + 54 patients contrôles) a été réalisée lors de l'épidémie de Malaisie. Les taux de mortalité parmi les patients traités et les populations non traitées ont été comparés. Pour la



*Figure 17 : Structure de l'Acyclovir (à gauche) et de la Ribavirine (à droite). En gris les atomes de Carbone, en blanc ceux d'Hydrogène, en rouge ceux d'Oxygène et en bleu ceux d'Azote*

première fois depuis l'apparition de ces virus, le taux de mortalité a baissé chez les personnes traitées, entre 54% et 32%. Mais cette étude n'a pas été réalisée en double aveugle et la distribution n'était pas aléatoire (Snell2004). De plus, le coût du traitement est prohibitif compte tenu des régions touchées par le virus Nipah.

- La Ribavirine a été utilisée pour soigner des vétérinaires infectés par le virus Hendra en Australie : 3 personnes ont été traitées, mais seulement une a survécu, soit moins que ce que l'on aurait pu attendre d'un virus mortel dans 50% des cas. Mais le nombre de personnes traitées est encore une fois beaucoup trop petit, et encore une fois rien n'a pas été réalisé en double aveugle, avec une distribution qui n'était pas aléatoire. Il est donc impossible d'en tirer des conclusions rigoureuses.
- Cependant, chez les hamsters, ni la Ribavirine, ni la 6-aza-uridine (un autre analogue nucléosidique), n'ont pu diminuer le taux de mortalité (Georges-Courbot2006).
- D'autres molécules ont prouvé leur efficacité chez le Hamster. Ainsi, le Poly(I)-poly(C12U), un puissant inducteur des interférons  $\alpha$  et  $\beta$ , a protégé 5 hamsters sur 6, à raison de 3 mg/kg/jour (Georges-Courbot2006).
- La pyrazofurine et le 5-éthynyl (un analogue de la Ribavirine) ont montré un pouvoir protecteur *in vitro* (Georges-Courbot2006).

En conclusion, les traitements thérapeutiques sont aujourd'hui quasi-nuls : seule la Ribavirine semblait avoir un effet, ce qui n'est pas satisfaisant compte tenu de son efficacité limitée et de son prix inabordable pour bon nombre de malades. Actuellement, la prévention du virus est bien plus au point que son traitement.

### ***VIII-3-Vaccination anti-Nipah***

Les glycoprotéines du virus Nipah sont très immunogènes. Une vaccination employant ces protéines est donc envisageable. En 2004, Guillaume *et al.* ont ainsi utilisé des particules recombinantes du virus de la vaccine exprimant les glycoprotéines du virus Nipah pour protéger des hamsters (Guillaume2004-) La réponse humorale d'un hamster ainsi immunisé permet l'élimination du virus et la survie de l'animal. Le transfert de ses anticorps vers un hamster non-immunisé protège ce dernier. Les anticorps ainsi produits ont été analysés, et des monoclonaux ont pu être développés (Guillaume2006#139).

Des essais sont actuellement en cours pour pouvoir vacciner les porcs, et ce à une échelle industrielle (Weingartl2006). Cependant, le développement de vaccin humain semble encore lointain, et risque de coûter très cher.

Les anticorps monoclonaux ont montré une activité protectrice utilisable en traitement préventif ou thérapeutique (Guillaume2006#139). Pour les utiliser chez l'être humain, il faut d'abord les humaniser, mais là encore le traitement sera probablement inabordable pour le Bangladesh et la plupart des pays touchés par les Henipavirus (Prabakaran2009) Cependant, l'Institut Américain de la Santé (NIH) viens de financer à hauteur de 5,6 m\$ un projet de ce type.

### ***VIII-4-Protéger les hommes en protégeant les chauves-souris?***

Virus de la Rage, SRAS-CoV, Filovirus, Henipavirus, ... La liste des pathogènes transmis aux hommes par les chauves-souris est effrayante. Le réflexe de nombreuses personnes, en particulier en Australie, est de « protéger les hommes en tuant les chauves-souris » comme l'a reporté récemment le *Brisbane Times*. Cela dit, il y a peu de chances que cela fonctionne : les chauves souris forment des colonies immenses qu'il serait difficile d'éradiquer. Dans le meilleur des cas (ou plutôt le pire) le résultat serait d'affaiblir les

colonies. Or, l'affaiblissement des colonies est déjà d'actualité, l'apparition de ces virus en est probablement la conséquence.

Si l'on compare l'évolution, dans les années 80 et 90, de la déforestation en Malaisie analysée par le Programme Environnemental des Nations Unis (*United Nations Environment Programme* – UNEP) avec la localisation des foyers épidémiques de 1998, on constate que le virus Nipah est apparu dans les zones les plus sévèrement touchées. Au Bangladesh, les foyers épidémiques correspondent aux zones de culture du palmier dattier (Luby2009). La culture du palmier dattier est une des plus grande cause de déforestation dans le monde, détruisant le milieu naturel des chauves-souris.

Selon Lin-Fa Wang (Wang, Communication Publique IUMS 2008), le réchauffement climatique pousse les *Pteropus* d'Australie à migrer du Nord du pays (forêt et jungle produisant abris et nourriture en abondance pour les chauves-souris) vers le Sud, beaucoup plus urbanisé (et qui donc ne possède pas de réserves alimentaires pour les chauves-souris).

Les chauves-souris de nombreux pays ont été testées positives aux Henipavirus, mais malgré cela, seules quelques épidémies dans le monde ont été recensées, toujours aux mêmes endroits. Une des explications pourrait être que la déforestation et le changement de milieu limitent l'approvisionnement alimentaire des chauves-souris, les rendant plus vulnérables aux infections, et donc plus contagieuses.

Protéger les chauves-souris et leur environnement naturel pourrait ainsi permettre de limiter les risques de transmission aux animaux d'élevage et aux humains. Une mesure complémentaire consiste à limiter les interactions entre humains et chauves-souris, notamment en empêchant à ces dernières l'accès au lait de palmier dattier (Luby, Communication Publique IMED 2009).

Compte tenu du nombre important de virus émergents liés aux contacts homme-chauves-souris, des mesures de protection de l'environnement naturel des chauves-souris constituent une protection simple et efficace contre ces épidémies. De plus, on peut dresser une liste de maladies dont l'homme peut être protégé grâce aux chauves souris et à leur place dans les écosystèmes : West Nile , Chikungunya, Paludisme, Fièvre Jaune, Dengue, Encéphalite Japonaise, Fièvre de la Vallée du Rift, Encéphalite de Toscane, et toute sortes d'arboviroses transmises par les moustiques, aliment incontournable pour les Microchiroptères (environ 600 par nuit pour la petite chauve-souris d'Europe *Pipistrellus pipistrellus*).

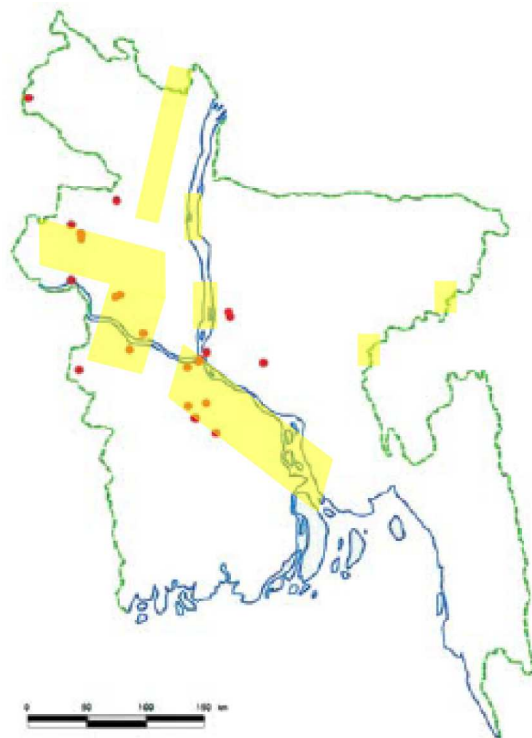
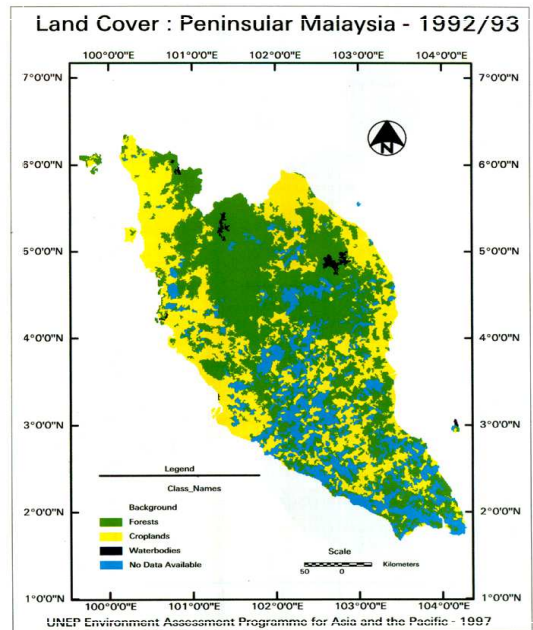
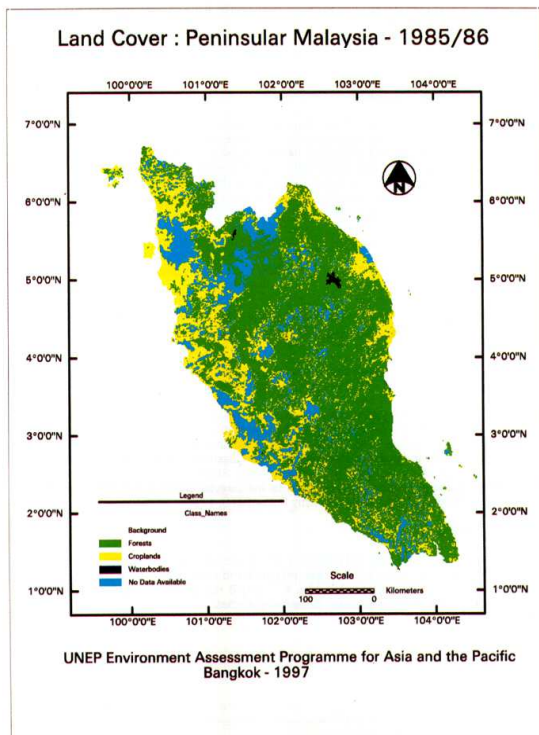


Figure 19 : En haut, carte montrant la répartition entre forêts (en vert) et zones cultivées (en jaune) sur la partie continentale de la Malaisie. A gauche, la carte de 1985/1986. A droite celle de 1992/1993. En bas, la carte des zones environnementales fortement dégradée du Bangladesh (en jaune) . Les épidémies (points rouges) ont eu lieu principalement dans ces zones (Sources : Programme Environnemental des Nation Unies, 1997 et FAO ;et Luby et al, 2009)

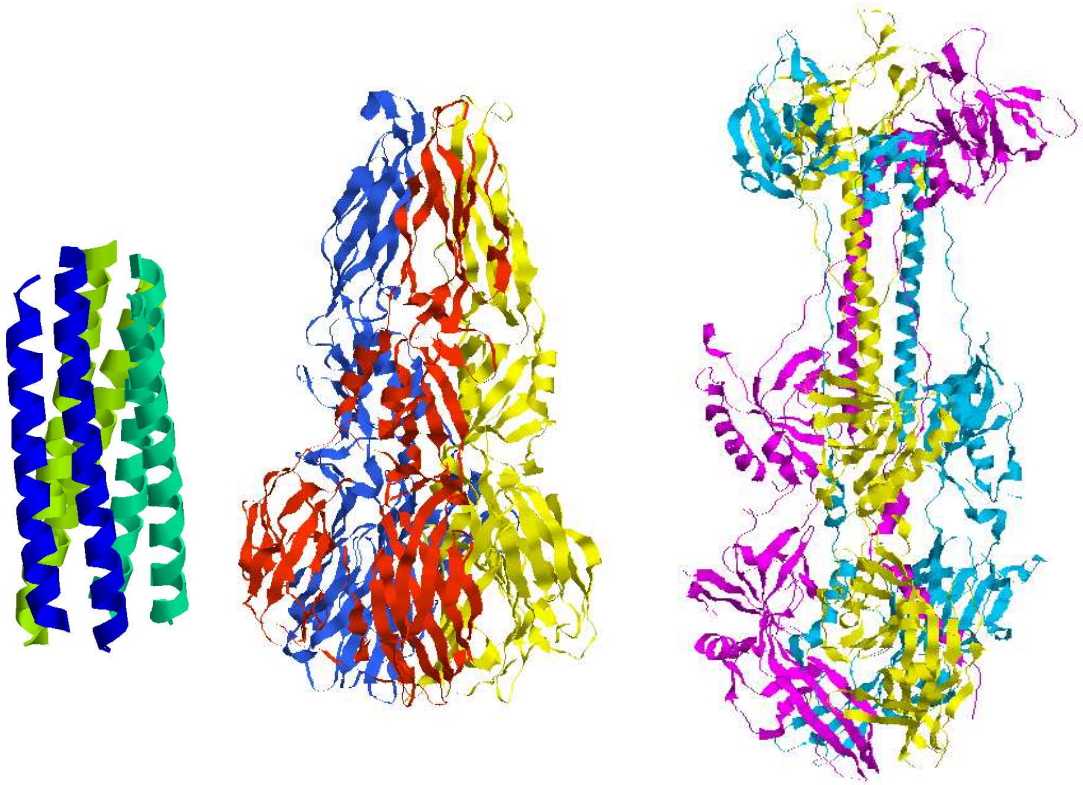
## IX-Mécanismes moléculaires d'entrée cellulaire des virus

### *IX-1-La fusion des membranes virales et cellulaires*

L'entrée cellulaire d'un virus correspond à une étape essentielle du cycle viral. Le virus doit relarguer son génome (plus précisément, son complexe ribo-nucléoprotéique) dans le cytoplasme de la cellule hôte pour pouvoir se répliquer. Or, deux bi-couches lipidiques séparent le génome viral du cytoplasme. Plusieurs types de signaux peuvent déclencher des mécanismes de fusion de ces membranes : attachement à un récepteur, changement de pH (et plus généralement des ions environnants) ou encore l'action de protéase. En faisant fusionner ces deux bi-couches, l'intérieur du virus et le cytoplasme ne font plus qu'un et le génome viral se retrouve de fait dans le cytoplasme : c'est l'entrée virale par fusion de membranes (Poranen2002). Il existe trois types de fusion décrits à ce jour pour les virus enveloppés.

#### ***Les protéines de fusion de classe I***

Les virus prototypes pour ce genre de fusion sont le virus de la grippe et le VIH. Les protéines de fusion de classe I sont constituées de deux hélices  $\alpha$  reliées l'une à l'autre et qui peuvent se déployer pour planter dans la membrane cellulaire un peptide fusion situé dans l'extrémité N-terminal de la protéine. Les deux hélices  $\alpha$  se replient alors l'une sur l'autre, grâce à leurs liaisons *coiled coil*, les membranes virales et cellulaires l'une contre l'autre, déstabilisées. La fusion permet aux membranes de se stabiliser. Les protéines de fusion de classe I agissent en trimère (Weissenhorn2007)(Backovic2009). Ce type de fusion étant celui des virus Hendra et Nipah, nous en reparlerons plus en détails ultérieurement.



*Figure 20 : les trois différents types de protéines de fusion : à gauche, un trimère des domaines HR1/HR2 du virus Hendra (Classe I, code PDB : 1WP8), au centre un trimère de glycoprotéine E du virus de l'encéphalite du tique en conformation de fusion (Classe II, code PDB : 1URZ) et à droite un trimère de glycoprotéine gB du virus de l'Herpes simplex 1 (Classe III, code PDB : 2GUM). D'après Weissenhorn et al, 2007.*



### ***Les protéines de fusion de classe II***

Les protéines de fusion de classe II se retrouvent chez les Flaviviridae et Togaviridae, deux familles de virus à ARN+. Ces protéines sont constituées de feuillets  $\beta$  et leur peptide fusion se trouve sur une boucle à l'intérieur de la protéine. En dimères, comme allongées le long du virus, les protéines se dressent et projettent leur peptide fusion lors de l'activation. Les peptides fusions se fixent dans la membrane cellulaire et les protéines se ré-associent en trimère, ce qui étire la membrane virale contre la membrane cellulaire et entraîne la fusion (Backovic2009)(Weissenhorn2007).

### ***Les protéines de fusion de classe III***

Les protéines de fusion de classe III se retrouvent chez des Rhabdoviridae, des Herpesviridae et les baculovirus, ce qui est très étonnant compte tenu de l'éloignement phylogénétique des deux premiers virus (respectivement ARN- et ADN). On ne les a clairement identifiés qu'en 2006 (Roche2006)(Heldwein2006). Les trois protéines, respectivement G, gB, et gp64 partagent leur structure, très similaire et originale. Comme les protéines de classe I, elles possèdent des domaines d'interactions *coiled coil* en leur centre dans la forme post-fusionnelle. Mais comme les protéines de classe II, elles sont constituées de feuillets  $\beta$  et ont leur peptide fusion sur une boucle interne (Backovic2009) (Weissenhorn2007).

### ***IX-2-La fusion virale : à la surface ou dans les endosomes***

Indépendamment du type de fusion, certains virus fusionnent à la surface et d'autres dans les endosomes. Pour certains virus (comme les Paramyxovirus), la fusion a lieu à la membrane plasmique à pH neutre. Pour certains autres, l'activation des protéines de fusion nécessite un déclenchement chimique : une baisse du pH par exemple. C'est par

exemple le cas du virus de la grippe. Le virion est internalisé par les vésicules de clathrine et envoyé vers les endosomes tardifs, plus acides, où la fusion pourra être déclenchée. D'autres virus utilisent des vésicules de cavéoline ou bien la macropinocytose pour le même but. Ces phénomènes d'internalisation seront étudiés dans le chapitre suivant.

## X-Mécanisme moléculaire d'entrée des Henipavirus (hypothèse actuelle)

### *X-1-L'interaction entre la glycoprotéine G et l'éphrineB2*

Le mécanisme d'entrée des Henipavirus n'a pas encore été étudié en profondeur. Par homologie avec les autres Paramyxovirus, le mécanisme d'entrée des Henipavirus est supposé se passer au niveau de la membrane plasmique comme suit:

Le mécanisme d'entrée virale commence par la reconnaissance de la cellule hôte. Comme nous l'avons vu précédemment, c'est la glycoprotéine d'attachement G qui reconnaît le récepteur cellulaire éphrineB2. Une étude fonctionnelle de la glycoprotéine G du virus Nipah a montré le rôle primordial des acides aminés W504 et E533 (et dans une moindre mesure E505, Q530, T531, A532, et N557) dans l'interaction avec l'éphrineB2 (Guillaume2006). Ces acides aminés se trouvent les uns à côté des autres, au sommet de la tête globulaire. Ils forment la crête d'un canyon hydrophobe au centre de la glycoprotéine (Bowden2008) exactement comme les acides aminés impliqués dans la reconnaissance de CD150 dans le cas de la glycoprotéine H de la rougeole (Massé2004). Il en est de même pour le virus Hendra (Thèse de Hamide Aslan, 2007).

Des études réciproques ont été réalisées par cristallographie. Elles ont démontré que les résidus de la boucle G-H de l'éphrineB2 entraînent dans le canyon de la glycoprotéine virale G. Cette interaction permet une association très stable des deux protéines, liant ainsi le virus à la cellule. On peut noter ici que cette boucle G-H est la même que celle utilisée pour la liaison avec EphB4 (Chrencik2006).

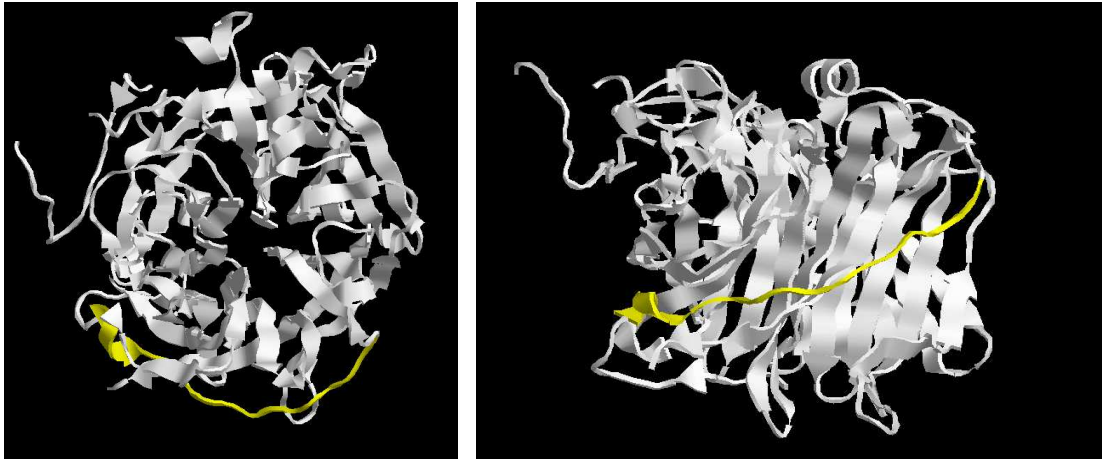


Figure 21 : Tête globulaire de la glycoprotéine G du virus Nipah vue du dessus (à gauche) et de profil (à droite) domaine. Le domaine  $^{203}ISYTLPVVG^{211}$  est marqué en jaune.

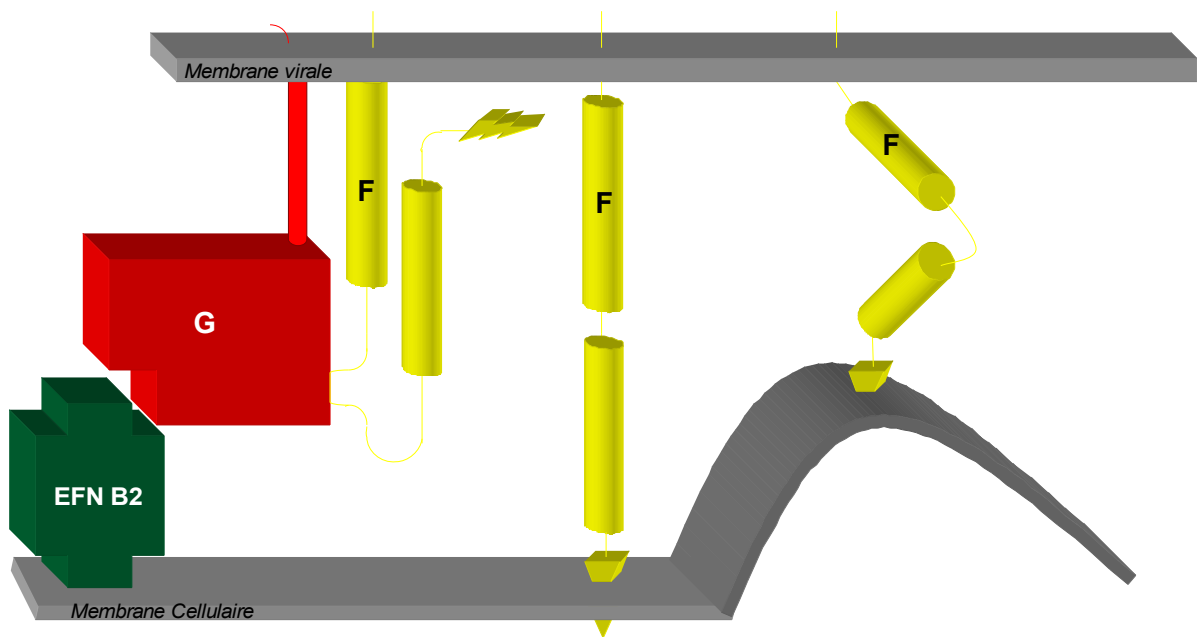


Figure 21 suite : Modèle hypothétique de l'activation de la glycoprotéine F : La glycoprotéine G reconnaît le récepteur et induit un changement de conformation de la glycoprotéine F. Le peptide fusion (flèche) pénètre dans la membrane cellulaire. Les domaines HR1 et HR2 (tubes jaunes) se ré-associent en déstabilisant la membrane.

## *X-2-L'interaction entre G et F, pré-requis pour la fusion*

Une fois que la glycoprotéine d'attachement G s'est fixée sur son récepteur, elle déclenche un changement de conformation de la glycoprotéine de la protéine G, au niveau des acides aminés <sup>203</sup>ISYTLPVVG<sup>211</sup>. Ce changement de conformation entraîne une autre, au niveau de la glycoprotéines F associée à cette glycoprotéine G. Si ce domaine <sup>203</sup>ISYTLPVVG<sup>211</sup> est bloqué (par un anticorps par exemple) ou muté, rien ne se passe, et il n'y a pas de fusion (Aguilar2009).

Le changement de conformation subit par la protéine F sépare les deux domaines HR et entraîne donc le peptide de fusion (domaine C-terminal de F<sub>1</sub>, très hydrophobe) vers la membrane cellulaire. D'abord associées, les hélices  $\alpha$  (domaines HR) sont ensuite dissociées au moment de l'activation. Le peptide fusion pénètre alors dans membrane plasmique, la déstabilise, et la ramène avec lui à proximité de la membrane virale, grâce à la ré-association des domaines HR par les liaisons *coiled coil*. Les deux membranes retrouvent leur stabilité en fusionnant l'une avec l'autre, permettant au virus de libérer son génome (sous forme de complexe ribonucléoprotéique) à l'intérieur de la cellule, dans le cytoplasme. (revue complète, voir Lamb *et al.*, 2007). Après une infection par le virus Nipah, une cellule n'est plus infectable. L'expression des glycoprotéines semble liée à cette protection, même si la cause est restée inconnue lors de la publication de ces résultats par une équipe canadienne (Sawatsky2007). Nous verrons dans la partie résultats l'explication de ce phénomène.

Lors de la réplication du virus, les protéines virales sont produites en grand nombre. Ainsi, beaucoup de glycoprotéines G et F se retrouvent à la surface de la membrane plasmique. Les cellules infectées sont donc capable de fusionner avec toutes les cellules environnantes exprimant le récepteur éphrineB2. L'infection passe ainsi de cellule en cellule, formant des syncytia (déjà évoqués) au niveau des foyers d'infection. Encore une fois, c'est une caractéristique partagée avec les Morbillivirus.

L'ensemble correspond à un mécanisme classique des Paramyxovirus : une fusion par protéine de classe I à la membrane plasmique, indépendamment du pH. Mais des analyses récentes, plus poussées, ont montré quelques exceptions à cette règle. Qu'en est-il actuellement de ce paradigme concernant l'entrée des Paramyxovirus?

### *X-3-Entrée cellulaire des Paramyxovirus : deux cas d'exception*

Le virus de la maladie de Newcastle (ou NDV) est un Avulavirus dont l'entrée est pH indépendant, comme les autres Paramyxovirus. Cependant, il est connu que l'acidité peut améliorer la fusion virus-cellule (San\_Román1999). Les fusions indépendantes du pH sont associées à des virus fusionnant à la membrane plasmique (tels les Paramyxovirus), alors que les fusions dépendantes du pH sont associées à une entrée par endocytose (tels les virus de la grippe).

La découverte d'un Paramyxovirus dont la fusion varie en fonction du pH a conduit une équipe espagnole à étudier plus en détails l'entrée de ce virus. Leurs résultats montrent qu'il peut entrer par endocytose, et plus précisément grâce à des vésicules de caveoline (Cantín2007).

Une étude publiée en 2003 par Creemin-Irvin *et al* montre que l'entrée de la souche vaccinale du virus de la rougeole ne colle pas tout à fait au postulat de fusion à la membrane décrit plus haut. En effet, de par la nature particulière de son récepteur CD46, l'entrée de cette souche pourrait être légèrement différente. Cette étude montre que lorsque CD46 entre en contact avec certains ligands, il est internalisé. Cela n'a rien d'extraordinaire compte tenu de la présence d'un motif d'internalisation YXXL dans la région juxta-membranaire.

Ainsi, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD46 induit une internalisation par vésicule à clathrine. En revanche, le contact avec la glycoprotéine H de la souche vaccinale du virus de la rougeole induit l'internalisation de CD46 dans de très grandes vésicules indépendantes de la présence de clathrine, ce qui indique selon les auteurs un mécanisme de macropinocytose (bien qu'aucune vérification spécifique n'ai été effectuée). Selon leurs conclusions, ce mécanisme permet d'internaliser les particules défectueuses de la membrane, limitant ainsi les risques d'éveiller le système immunitaire (Crimeen-Irwin2003), mais il est plus probable que ce soit un mécanisme d'entrée du virus. En effet, un tel mécanisme d'entrée sera présenté pour le virus Nipah, dans la partie « Résultats » de cette thèse. Il ne serait pas étonnant que l'étude de l'entrée des Henipavirus nous apprenne de nouvelles informations concernant l'entrée d'un Morbillivirus (rougeole,...) : ce sont les deux seuls genres de Paramyxovirus connus à ce jour utilisant un récepteur protéique plutôt que l'acide sialique.

## XI-Macropinocytose

### *XI-1-Les voies endocytiques : des voies détournée par les pathogènes*

Il existe plusieurs raisons et plusieurs manières pour une cellule de prélever et internaliser un échantillon de milieu ou de sa membrane. Toutes ces voies endocytiques sont utilisées par des virus, et d'autres pathogènes intra-cellulaires, pour entrer dans la cellule (Mercer2009). Voici quelques-unes de ces voies :

Lorsque le but est d'absorber un corps étranger à la cellule, on parle de phagocytose, et lorsqu'il s'agit de liquide on parle de pinocytose. La phagocytose est un mécanisme utilisé principalement par cellule immunitaire. Elle permet le prélèvement, l'internalisation et la dégradation des corps non-soi. La phagocytose est un mécanisme induit par l'activation de récepteurs tel les récepteurs Fc.

Les mécanismes de pinocytose permettent à la cellule de « boire » (d'après l'étymologie), c'est-à-dire de récupérer une partie du milieu extra-cellulaire. Ces mécanismes peuvent être activés par des ligands spécifiques présents à proximité de cellules exprimant leurs récepteurs, comme dans le cas des vésicules à triskels de clathrine. C'est par ce mécanisme que la cellule peut détecter et internaliser le fer (grâce aux récepteurs TFRs) ou les lipoprotéines de basse densité (grâce aux récepteurs LDLRs)(Grant2009).

D'autres formes d'internalisation peuvent dépendre d'un récepteur. L'endocytose par vésicules à cavéoline, une autre forme de pinocytose, peut être induite par l'activation de récepteur, bien que tout ne soit pas clair dans ce domaine. En effet, les vésicules à cavéoline sont plus connues comme constitutives, participant à l'internalisation et au transport, voir à la transcytose, mais aussi à la régulation de certains signaux émis par des protéines membranaires, à la migration cellulaire et enfin dans la régulation des lipides (Parat2009).

La macropinocytose, une troisième forme de pinocytose, peut être induite par l'activation d'un récepteur (par exemple un récepteur aux facteurs de croissance) ou être constitutive (chez certaines cellules immunitaires). Elle est détournée par de nombreux pathogènes, comme nous le verrons un peu plus loin. D'un point de vue moléculaire, la macropinocytose est très proche de la phagocytose, bien que le but ne soit pas le même comme nous allons le voir maintenant (Mercer2009).



*Figure 22 : Les différents types d'endocytose. De gauche à droite : l'endocytose par vésicules recouvertes de triskels de clathrine, les vésicules à cavéoline, la macropinocytose et la phagocytose. A noter que pour la macropinocytose, la protusion peut être un filopode, un bleb ou un reflux de membrane (D'après Mercer et Helenius, 2009)*

## ***XI-2-Définition et rôles de la macropinocytose***

La macropinocytose est un mécanisme cellulaire qui permet à la cellule d'internaliser une grande quantité de fluide extra-cellulaire. Ce mécanisme est conservé des amibes (*Dictostelium discoïdum*) aux mammifères. Elle est souvent liée à une activation des récepteur aux facteurs de croissance, en particulier les récepteurs tyrosine kinase (RTK), ou aux esters de phorbol (Haigler1979). Les fluides extra-cellulaires internalisés forment de très grande vacuoles pouvant représenter 5 à 10 fois le volume extra-cellulaire internalisé de base. La formation de ces vacuoles est dépendante de l'actine et indépendante de la clathrine. Il existe aussi une macropinocytose constitutive, notamment chez les cellules dendritiques immatures. L'ingestion de grand volume de milieu extra-cellulaire leur confère ainsi une grande efficacité dans le rôle de veille immunitaire (Mercer2009).

La macropinocytose a plusieurs rôle qui diffèrent selon les types cellulaires étudiés. Elle peut avoir un rôle dans le chémotactisme (chez *D.discoïdum* par exemple (Somesh2006) ou les cellules migratrices), la morphologie (notamment au niveau des cônes de croissance axonaux (Faix2006), un rôle de phagocytose - par exemple chez *D.discoïdum* (Somesh2006) - ou encore de récupération d'antigènes - chez les cellules dendritiques (Norbury2006).

## ***XI-3-Le déroulement de la macropinocytose***

La macropinocytose peut être observée sur les cellules au niveau des zones de reflux de la membrane cytoplasmique. Ce phénomène est utilisé par la cellule notamment pour se déplacer et suivre des signaux chémotactiques. Le reflux de membrane peut aussi être induit par des parasites cellulaires utilisant la macropinocytose pour entrer dans leur cellule hôte. Durant le reflux de membrane, le cytosquelette d'actine est réorganisé de façon à permettre l'étalement et l'étirement de la membrane au niveau de la zone concernée. L'étirement se caractérise par la formation de filopodes et l'étalement par la formation d'un lamellipode. La dynamine, un marqueur spécifique des vésicules de clathrine et de cavéoline qui permet la séparation de la surface de la membrane plasmique (et donc la fermeture de la



vésicule) n'est pas impliquée dans la macropinocytose.

Lors de la formation des lamellipodes, les filopodes se rétractent et se referment en formant une boucle. Ils forment ainsi une grande vésicule intracellulaire: le macropinosome. Les macropinosomes ainsi formés peuvent fusionner les uns aux autres, avec des lysosomes ou d'autres endosomes.

D'une manière générale, on peut considérer les phénomènes de reflux de membrane comme une étape précoce de la macropinocytose. Les protéines impliquées dans le chémotactisme (récepteur aux facteurs de croissance ou lié à la migration cellulaire) induisent la formation de ces structures précurseurs de la macropinocytose (Mercer2009). Ainsi, l'éphrineB2, (qui rappelons-le possède une activité tyrosine-kinase) impliquée principalement dans la migration des cellules nerveuses et endothéliales, induit la formation de filopodes qui permettent à la cellule de détecter, sur les membranes des cellules voisines, la présence de marqueurs attractifs ou répulsifs. L'éphrineB2 peut ainsi être un déclencheur de la macropinocytose (Pernet2009).

#### ***XI-4 Mécanismes moléculaires et inhibiteurs de la macropinocytose***

Les mécanismes moléculaires permettant la formation des vacuoles macropinocytiques sont conservés depuis les amibes jusqu'aux mammifères. Ainsi, les amibes *Dictostelium discoïdum* fournissent un modèle de choix pour les étudier. D'une manière générale, les récepteurs RTK activés par leur ligand induisent une cascade de phosphorylation (en particulier via des Rho GTPase (Ridley1992)) qui va activer les régulateurs du cytosquelette Rac1 et Cdc42.

Les protéines adaptatrices Grb détectent les activations des RTK et activent en retour Ras. Ras active alors 4 voies différentes :

- la voie Arf6
- la voie Rab5
- la voie Rac1/Cdc42
- la voie PI3K

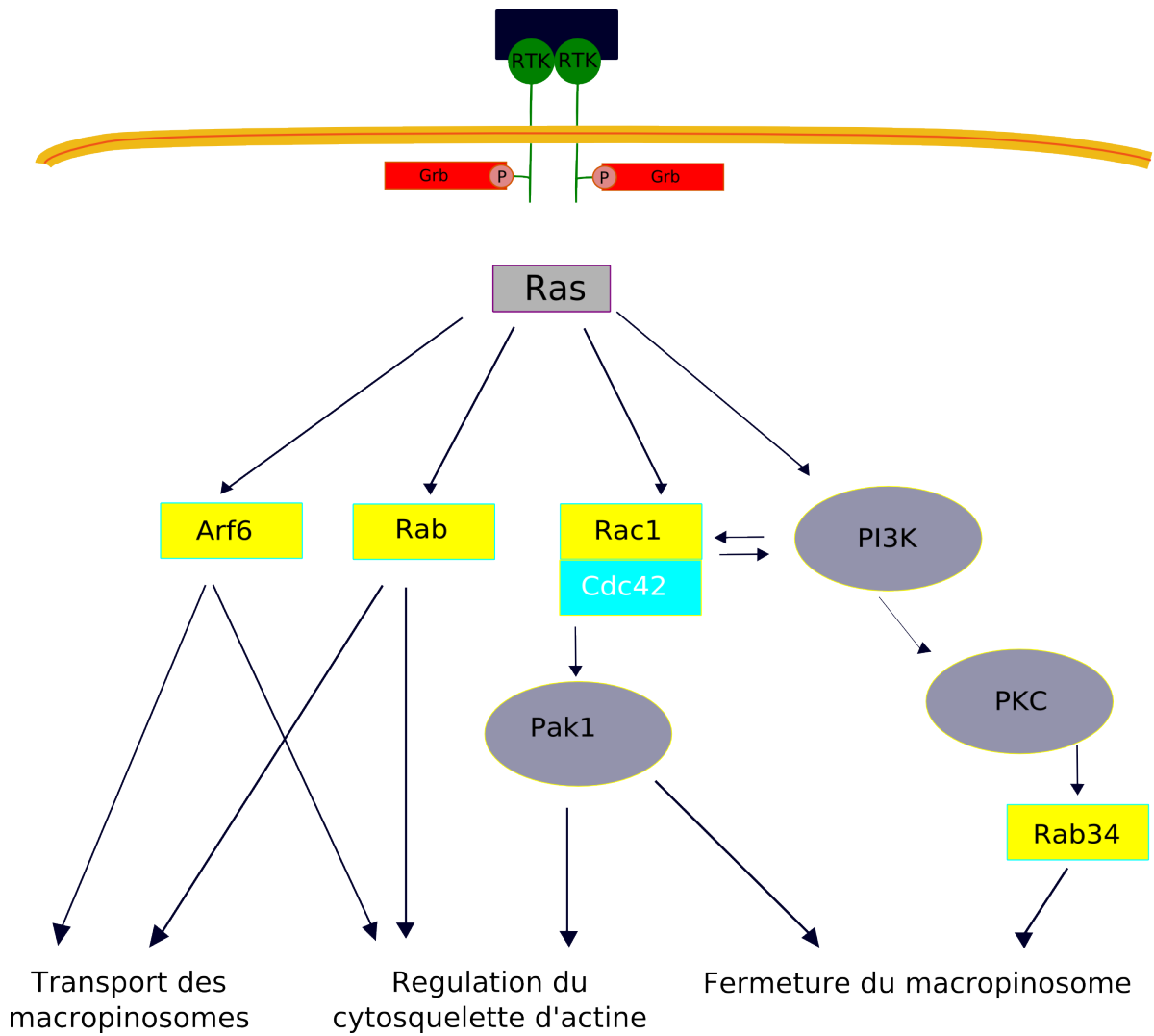


Figure 23 : Schéma simplifié des voies de signalisation de la macropinocytose. Les kinases sont représentées par des ovales et les GTPase par les rectangles (d'après Mercer et Helenius, 2009 (Mercer2009))

Arf6, connu pour son rôle dans le trafic des vésicules intra-cellulaires et les modifications morphologiques de la membrane plasmique, permet le recyclage à la membrane de Rac1 et peut ainsi initier la macropinocytose (Radhakrishna1999).

Rab5 re-localise les reflux membranaires et les circularise avec la protéine RNTre et son action sur l'actine F (Lanzetti2001)(Mercer2009).

Rac1/Cdc42 est le couple central de la macropinocytose. Cdc42 permet la formation des filopodes. Rac1 va réguler les mécanismes de reflux de membrane, la formation et la fermeture du macropinosome (en agissant notamment sur la myosine IIA, indispensable à la fermeture du macropinosome) ainsi que les mouvements de la vésicule. En effet, Rac1 et Cdc42 induisent l'activation de Pak1 (*p21 activated kinase*) qui régule la motilité cellulaire (réorganisation de l'actine) et la fermeture du macropinosome via CtBP ou le couple MLCK/MLC. Rac1 active aussi la PI3K (Trizma, 2006 ; (Mercer2009). Ensemble Rac1 et Cdc42 agissent comme un interrupteur moléculaire qui contrôle l'extension (filopodes) ou le reflux de la membrane plasmique. Un détail intéressant : plusieurs études récentes de Rac1 /Cdc42 ont été réalisées sur des cellules endothéliales, notamment grâce à des expériences d'étirement / cisaillement (Vandenbroucke2008)). Or ce genre de stress est connu pour modifier l'expression d'éphrineB2 dans les cellules endothéliales (Goettsch2004) (Obi2009).

La PI3K va induire le même phénomène (fermeture) mais via la voie PKC / Rab34 (Mercer2009).

Nous constatons ici que les voies d'activation et de régulation de la macropinocytose sont redondantes, croisées et impliquent des protéines vitales pour bien d'autres fonctions cellulaires. C'est pourquoi il est difficile d'avoir un inhibiteur de la macropinocytose efficace à 100% et réellement spécifique.

Cependant, en 1989, West et son équipe publient leurs résultats concernant l'amiloride. Il s'agit d'un inhibiteur des échangeurs Sodium / Proton (NHE). Sa présence dans le milieu extra-cellulaire semble bloquer la macropinocytose (West1989) . L'amiloride est utilisé dans certains traitements médicaux, par exemple dans les cas d'hypertension. Son effet sur les reins permet un moindre re-captage des molécules d'eau et diminue donc la tension artérielle sans l'évacuation concomitante du potassium (ce qui peut poser des problèmes d'hyperkaliémie), ce qui lui vaut le qualificatif de diurétique non-hypokaliémant. Depuis, des analogues de l'amiloride tels que l'EIPA (Ethyl isopropyl amiloride) ont montré une plus grande efficacité et spécificité dans l'inhibition de la macropinocytose .

## *XI-5-Détournement de la macropinocytose par les pathogènes*

De par son rôle d'internalisation cellulaire de gros volume, la macropinocytose est un mécanisme d'entrée cellulaire de choix pour nombreux parasites cellulaires. En voici quelques exemples :

### **Bactéries**

De nombreuses bactéries sont des parasites intracellulaires. L'entrée cellulaire par macropinocytose est une solution adaptée à la taille de ces bactéries. Les entrées cellulaires de plusieurs bactéries pathogènes pour l'humain ont été étudiées, et l'utilisation de la macropinocytose a été confirmée pour certaines.

Parmi elles, *Neisseria gonorrhoeae*, une bactérie sexuellement transmissible et responsable des gonorrhées. C'est en se liant à son récepteur qu'elle déclenche la macropinocytose (Zenni2000). Il s'agit du même récepteur que le virus de rougeole : CD46 (Cattaneo2004). L'attachement de la bactérie au récepteur induit la phosphorylation de la queue cytoplasmique de ce dernier, sur la tyrosine 354. (Lee2002). Les mêmes observations ont été faites pour une autre espèce, responsable de méningite : *N.meningitidis* (Gill2004).

*Salmonella enterica*, une bactérie responsable d'intoxications alimentaires ainsi que de la fièvre typhoïde, utilise aussi la macropinocytose pour parasiter les cellules. Elle produit trois protéines SopE, SopE2 et SopB qui prennent le contrôle du couple Rac1/Cdc42 et contrôlent ainsi la régulation du cytosquelette (Patel2006).

Le bacille de Malassez et Vignal (*Yersinia pseudotuberculosis*) est une bactérie du colon. Il est assez peu dangereux pour l'homme, même s'il peut être responsable d'adénites, et est parfois suspecté de jouer un rôle dans la maladie de Crohn (Ragnarsson2008). A la surface de cette bactérie se trouve des protéines associées à l'adhésion bactérienne et à la virulence : l'invasine, YopE et YopT. La protéine invasine se lie à divers  $\beta 1$  intégrines (une molécule impliquée dans la motilité cellulaire, comme l'éphrineB2), ce qui provoque une dérégulation de Rac1 (Mohammadi2009) et l'apparition

de macropinosomes (Ragnarsson2008). YopE et YopT interviennent aussi dans les voies de signalisation de Rac1, notamment en dérégulant RhoG (Mohammadi2009).

Plus étrange est le cas de *Francisella tularensis*. *F.tularensis* est la bactérie responsable de la tularémie, une zoonose de l'hémisphère Nord. Cette bactérie est capable de traverser la peau saine, et seulement 25 bactéries inhalées sont suffisantes pour conduire à la mort. Elle est donc considérée comme une arme biologique potentielle, au même titre que les virus Nipah et Hendra. Des observations en microscopie électronique ont montré que l'entrée cellulaire de ces bactéries se faisait par l'enroulement d'un bacille dans un (ou plusieurs) filopode ensuite internalisé, exactement ce que l'on observe lors de la macropinocytose. Cependant, le volume formé par les replis des filopodes était si grand (par rapport à ceux observés avec *S. enterica*) que les auteurs ont préféré parler d'un « nouveau mécanisme » non spécifié (Clemens2005). Cette conclusion est un peu étonnante, d'autant qu'aucun des inhibiteurs spécifiques de la macropinocytose n'a été testé dans leur protocole.

### **Virus**

Les bactéries ne sont pas les seules à utiliser la macropinocytose pour pénétrer dans les cellules. Les virus aussi en sont capables. J'ai déjà évoqué dans cette thèse des observations concernant le virus de la rougeole. L'internalisation des complexes virus-CD46 par macropinocytose se fait d'ailleurs sous le contrôle direct de Rac1 (Crimeen-Irwin2003). Il existe d'autres exemples, concernant des virus très différents les uns des autres. D'une manière intéressante, on constate que l'internalisation n'est pas réservée aux virus qui fusionne à pH acide :

L'adénovirus humain de sérotype 3 est responsable de conjonctivites et d'infections pulmonaires. Comme précédemment pour les bactéries *Neisseria* et le virus de la rougeole, son récepteur cellulaire est CD46. Et comme précédemment, il entre par macropinocytose (Amstutz2008) Dans ce cas précis, Cdc42 ne semble pas important. Mais sur les photographies publiées des cellules HeLa sur lesquelles ont été réalisés ces travaux, on voit déjà des filopodes. Quant à l'adénovirus de sérotype 2, il pénètre dans les cellules épithéliales à la fois par macropinocytose (grâce au co-récepteur cellulaire  $\alpha_v$  integrine) et par vésicules de clathrine (Meier2002).

Le virus de la dengue de type 2 entre lui aussi par ces deux voies : 80% des virus sont internalisés par vésicules de clathrine et les 20% qui restent le sont par macropinocytose. Cette proportion de 80% d'entrée par vésicules de clathrine se retrouve chez d'autres Flavivirus (notamment le virus West Nile), et les 20% restant ne sont pas encore expliqués. Peut-être la macropinocytose chez les Flavivirus est-elle plus répandue que l'on ne l'imaginait jusqu'à présent (Suksanpaisan2009).

Le VIH peut lui aussi entrer par macropinocytose. Ce mode d'entrée alternatif a déjà été observé pour des macrophages primaires (Maréchal2001). C'est aussi par macropinocytose que le VIH pénètre dans l'endothélium micro-vasculaire du cerveau (zone d'infection des Henipavirus) et franchit la barrière hémato-encéphalique (Liu2002)

Le virus de la vaccine est le prototype pour l'étude des Poxvirus. Ce sont de très gros virus (trop gros pour les vésicules à clathrine ou à cavéoline) qui peuvent fusionner à la membrane plasmique ou dans des compartiments intra-cellulaires acides (plus efficace). C'est donc sans surprise que le virus de la vaccine utilise lui aussi la macropinocytose. En plus d'entrer dans la cellule hôte, il utilise la macropinocytose pour tromper la surveillance du système immunitaire : le déclenchement de la macropinocytose se fait en mimant des corps apoptotiques. La macropinocytose de corps apoptotiques est en effet connu pour bloquer les réponse du système immunitaire inné (Mercer2008).

## **CHAPITRE SECOND**

### **RESULTATS**

# I-Étudier l'entrée cellulaire des Henipavirus : besoin de nouveaux outils

## *I-1-Problématique*

Le but premier de cette thèse était d'étudier les interactions entre la glycoprotéine G du virus Nipah et l'éphrineB2, en particulier d'identifier le site d'interaction de l'éphrineB2. Mais une telle étude se heurte à deux obstacles. Premièrement, l'ADN codant l'éphrine B2 humaine (hEFN B2) est particulièrement instable, difficile à manipuler sans recombinaison. Le premier protocole permettant une utilisation aisée de cet ADN ne date que de Février 2006 (Day2006). Nous avons donc dû mettre au point une construction permettant la modification de l'éphrineB2 par mutagenèse dirigée. Deuxièmement, à cause de l'importante conservation entre les séquences des éphrineB2 chez différentes espèces (et même de différentes classes) il n'existe aucun anticorps réellement spécifique qui permettrait de contrôler l'expression de l'éphrineB2. Il fallait donc trouver un autre moyen de vérifier l'expression de l'éphrineB2 et de ses mutants. Plusieurs approches ont été tentées. Tout d'abord, marquer radioactivement l'éphrineB2 en utilisant pour cela un système de culture cellulaire avec des acides aminés marqués au  $^{35}\text{S}$ . Une autre approche consiste à ajouter en N-terminal (domaine extracellulaire) un épitope reconnu par un anticorps utilisable en cytométrie. Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé un épitope c-Myc. Mais cet épitope pourrait gêner l'interaction avec la glycoprotéine G qui dépend aussi du domaine extra-cellulaire. Enfin, l'éphrine B2 peut être fusionnée à l'eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*, Protéine Verte Fluorescente) au niveau du domaine C-terminal (domaine cytoplasmique).



## *I-2-L'éphrineB2-Myc*

Une manière de localiser précisément et facilement l'éphrineB2 est de lui associer une séquence peptidique (épitope) précisément et facilement localisable. Une de ces séquences est l'épitope c-Myc : EQKLISEEDL. Pour insérer cette séquence dans la région N-terminale de l'éphrineB2, il suffit d'amplifier le gène correspondant (hEFN B2) en intégrant la séquence codant l'épitope dans l'amorce, juste après la séquence codant le codon initiateur et dans le même cadre de lecture que la séquence codant le début d'éphrineB2. Le fragment ainsi amplifié est échangé par digestion des amplicons et ligations avec le fragment correspondant du phCMV-XL4-EFNB2 Δ3'.

Ce nouveau vecteur phCMV6-XL4-cMyc-hEFNB2 Δ3' a été transfecté dans des cellules CHO. 48 heures après la transfection, l'expression de la protéine c-Myc-hEFNB2 y a été analysée :

- en test de fusion : le but est de vérifier que malgré l'épitope c-Myc, l'éphrineB2 conserve ses propriétés de récepteur pour le virus Nipah. Pour cela, le vecteur codant c-Myc-éphrine B2 est co-transfecté avec des vecteurs codant les glycoprotéines F et G. La formation de syncytia est analysée et quantifiée.
- en cytométrie de flux, avec un anticorps primaire anti-c-Myc et un anticorps secondaire couplé à la FITC (FL1-H). Un marquage à l'Iodure de Propidium (FL3-H) permet de différencier les cellules mortes des cellules vivantes et de sélectionner spécifiquement ces dernières pour l'analyse d'intensité en FITC

Il y a un moyen très facile de savoir si un Henipavirus, ou du moins ses glycoprotéines, est fonctionnel : la formation de syncytia. Si des glycoprotéines mutées ne fonctionnent pas correctement, ou si le virus ne peut pas entrer dans la cellule, on n'observe pas de syncytia. Les résultats de ce test de fusion montrent que l'éphrineB2 conserve ses propriétés de récepteur pour la glycoprotéine G malgré l'épitope c-Myc. Cependant, le nombre de syncytia est moins important que pour l'éphrineB2 sans épitope c-Myc.

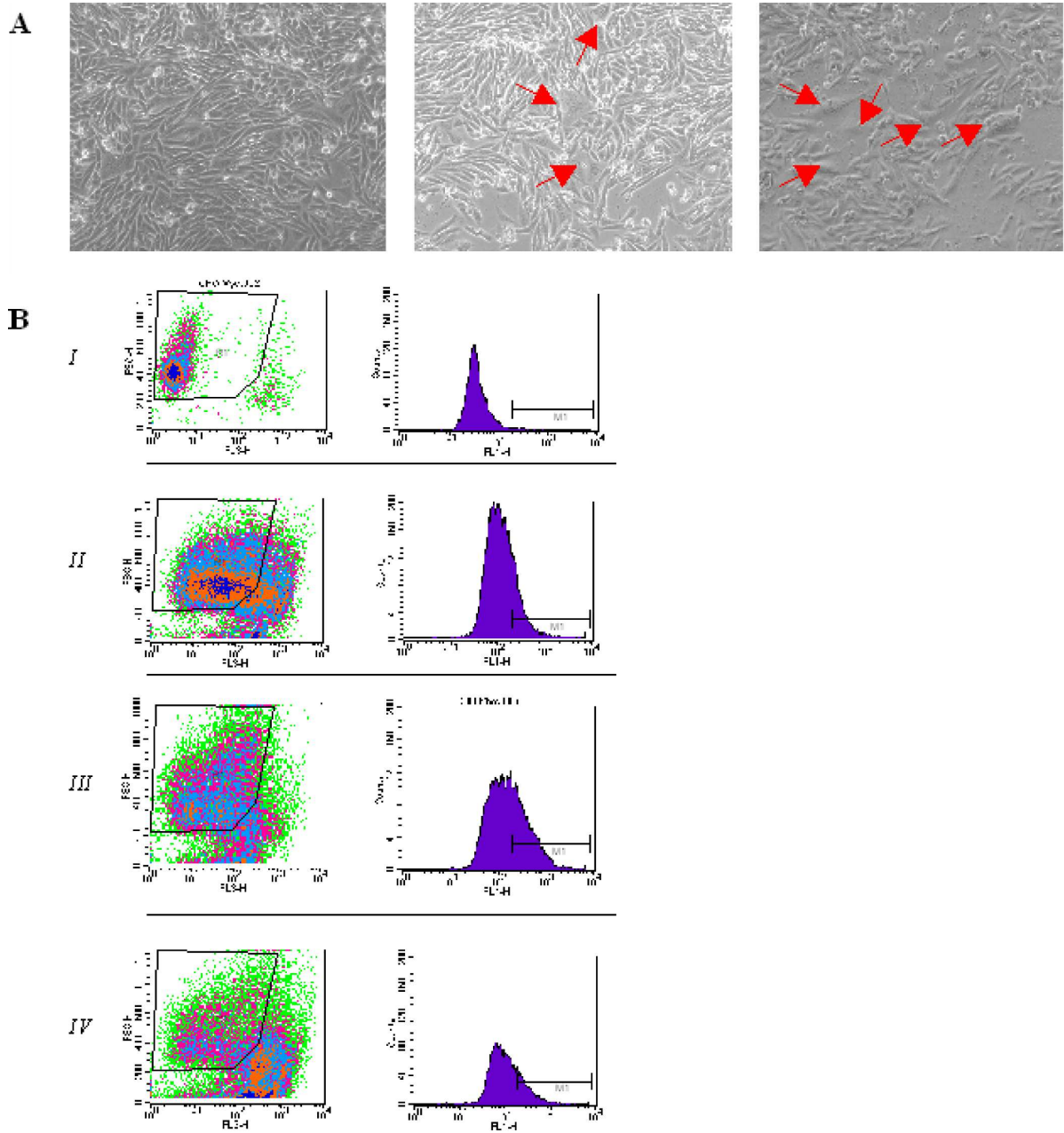


Figure 24 : A| Les cellules CHO transfectées avec  $1\mu\text{g}$  de *phCMV6-XL4-cMyc-hEFNB2  $\Delta 3'$*  et  $1,1\mu\text{g}$  de *phCMV* vide (à gauche) ne présentent aucun syncytia. Les cellules transfectées de la même façon mais avec  $1\mu\text{g}$  de *phCMV-VN-F* et  $0,1\mu\text{g}$  de *phCMV-VN-G* à la place du *phCMV* vide (au centre) présentent des syncytia (flèche rouge) mais en nombre plus limité que les cellules transfectées avec  $1\mu\text{g}$  *phCMV6-XL4-hEFNB2  $\Delta 3'$*  (à droite) au lieu des  $1\mu\text{g}$  de *phCMV6-XL4-cMyc-hEFNB2  $\Delta 3'$* . B| Des cellules CHO sont transfectées avec  $3\mu\text{g}$  de plasmide dont  $0\mu\text{g}$  (I),  $1\mu\text{g}$  (II),  $2\mu\text{g}$  (III) et  $3\mu\text{g}$  (IV) de plasmide *phCMV6-XL4-cMyc-hEFNB2  $\Delta 3'$* , le reste étant complété avec le vecteur vide *phCMV*. Elles sont marquées le lendemain avec un anticorps monoclonal anti *c-Myc* puis avec un anticorps secondaire conjugué à la FITC (FL1-H), et enfin avec  $10\mu\text{L}$  d'Iodure de Propidium (FL3-H). L'analyse est réalisée par cytométrie de flux immédiatement. Avec  $1\mu\text{g}$  de plasmide, plus de 25% des cellules expriment efficacement la protéine *c-Myc-éphrine B2*, plus de 45% avec  $2\mu\text{g}$ . Au delà, la transfection semble avoir un effet délétère sur la viabilité cellulaire et sur l'expression de la protéine *c-Myc-éphrine B2* (seulement 25% de cellules marquée).

Les cellules expriment correctement l'éphrineB2 puisque l'on détecte l'épitope c-Myc à la surface des cellules. La transfection avec 2µg de plasmide semble être la plus efficace avec près de la moitié des cellules marquées et une intensité moyenne sur l'axe (*Mean*) de 512. Cette construction apparaît donc comme une solution pour quantifier l'expression de l'éphrine B2 ou de ses mutants.

Cependant, le marquage à l'Iodure de Propidium montre que plus la quantité de plasmide codant c-Myc-éphrineB2 augmente, plus le nuage représentant les cellules analysées se déplace de la zone des cellules vivantes étudiées (dans fenêtre R1) vers la zone des cellules ayant un signal en FL3-H élevé, c'est-à-dire des cellules mortes (hors de R1). L'éphrineB2 marquée avec l'épitope c-Myc semble donc avoir un effet toxique sur les cellules. L'effet est tel qu'avec 3µg, le nombre de cellules vivantes se limite à 5000.

Cette construction a beaucoup trop d'inconvénients pour être utilisée en étude fonctionnelle : l'éphrineB2 a non seulement perdu une partie de ses propriétés de récepteur mais en plus elle est devenue cytotoxique. Une autre solution était donc nécessaire.

### ***I-3-L'éphrineB2-eGFP***

La seconde possibilité pour localiser l'éphrineB2 est d'y ajouter un marqueur fluorescent, dans ce cas l'eGFP. Réaliser une protéine de fusion avec l'eGFP a un avantage certain : une telle construction permet de suivre la localisation de l'éphrineB2.

La séquence hEFN B2 a donc été ajoutée dans le plasmide peGFP-NI, avec à la place de son codon Stop, le début de la séquence eGFP, en phase. Il faut ensuite vérifier la localisation et l'activité de cette éphrineB2 et la comparer à celle de la protéine native. Comme précédemment, des CHO sont transfectées. La localisation et la capacité de la protéine à servir de récepteur au virus sont vérifiées.

La localisation de l'éphrineB2-eGFP est comparée par rapport à celle de l'éphrineB2 grâce à des protéines EphB4-Fc (EphB4 soluble fusionnée avec le domaine Fc

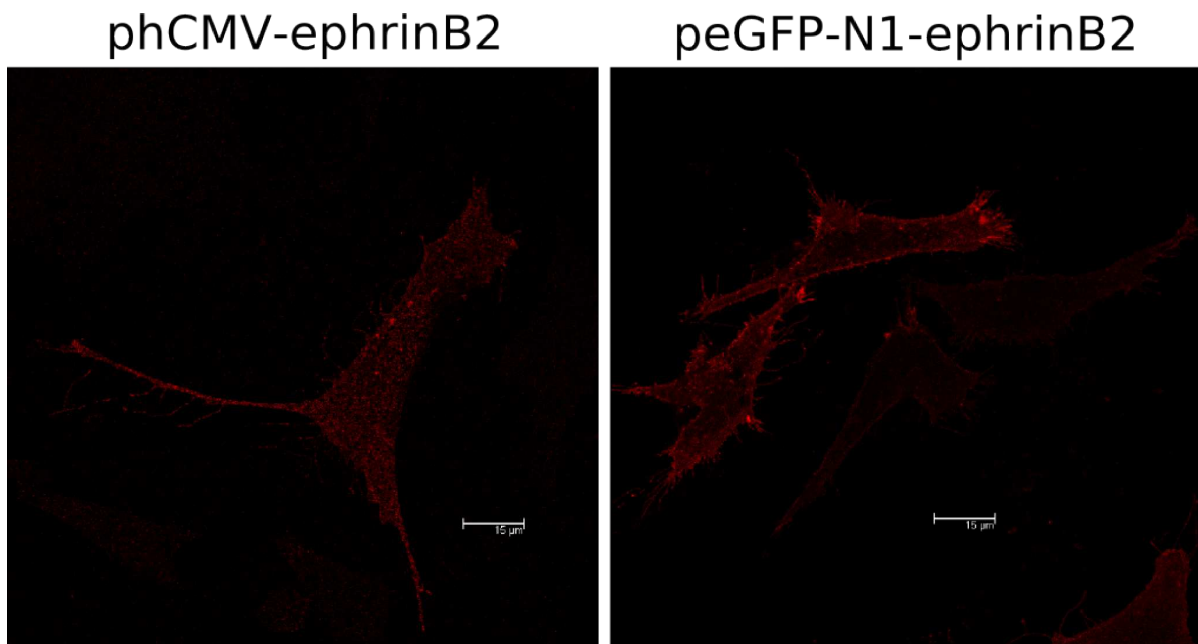


Figure 25 : La localisation de l'éphrineB2-eGFP ne diffère pas de la localisation de l'éphrineB2 sauvage : membranaire. De plus, on constate dans les deux cas la production de très longs filopodes que l'on n'observe pas habituellement chez les CHO (Pernet2009)

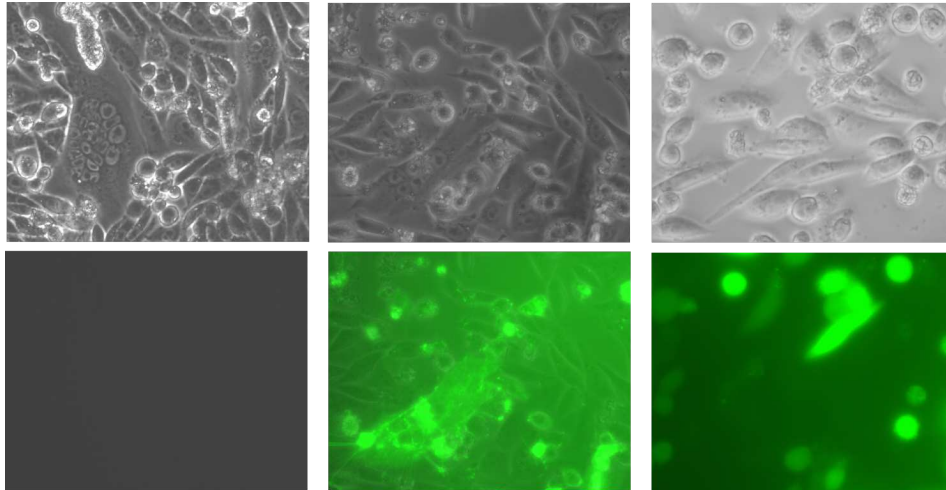


Figure 26 : L'efficacité de la fusion ne diffère pas entre l'éphrineB2 sauvage (à gauche) et l'éphrineB2-eGFP (au centre). A droite, l' eGFP seule ne permet pas la fusion. En haut contraste de phase, en bas fluorescence eGFP.

d'un anticorps) purifiées. EphB4-Fc est un bon moyen de localiser l'éphrineB2 sur des cellules n'exprimant pas (hors cas de transfection) des protéines de la famille des éphrines. Mais c'est un outil inutilisable pour des analyses précises sur des cellules exprimant plusieurs types d'éphrines.

L'éphrineB2 native et la version « eGFP » montrent en microscopies à fluorescence classique et confocale la même localisation : membranaire. Le test d'activité se fait par le test de formation de syncytia : des cellules CHO sont co-transfectées avec le plasmide codant éphrineB2 (native ou eGFP) et ceux codant les glycoprotéines du virus Nipah. Là encore, il est impossible de voir une différence entre l'éphrineB2 native et la version marquée eGFP. De plus, des analyses par électrophorèse sur gel d'agarose ont montré que cette construction est stable et non recombinée.

La construction peGFP-NI-EFN B2 est donc le meilleur outil pour observer la localisation, l'expression et (peut être) l'internalisation de l'éphrineB2

## II-L'éphrineB2 est internalisée en présence de NiV-G

### *II-1-Observations*

En 1993, l'équipe de Chantal Rabourdin-Combe montrait que le récepteur CD46 est régulé négativement de la surface après une infection par une souche vaccinale du virus de la rougeole, et que le même phénomène était observable lors de la simple expression de la glycoprotéine d'attachement H de ce virus. En fait, le récepteur CD46 serait massivement internalisé en présence de la glycoprotéine H (Naniche1993.)(Varior-Krishnan1994). Ce mécanisme permettrait d'éviter une surinfection de la cellule. La co-expression de l'éphrineB2-eGFP et de la glycoprotéine G permettrait de savoir si une telle régulation négative a lieu dans le cas d'infection par le virus Nipah.

Notre hypothèse de travail était que si l'éphrineB2 est régulée négativement par la glycoprotéine G (comme CD46 avec la glycoprotéine H), ce mécanisme pourrait être utilisé pour détecter les acides aminés nécessaires à la liaison entre ces deux protéines. En mutant ces acides aminés, on empêcherait la reconnaissance et donc l'internalisation massive. La première étape consistait donc à vérifier cette hypothèse : l'éphrineB2 est régulée négativement par la glycoprotéine G.

L'éphrineB2-eGFP permet d'étudier la localisation de l'éphrineB2 dans différentes conditions. On peut ainsi voir si le virus Nipah régule négativement son récepteur cellulaire, et dans ce cas, si cela est induit par sa protéine d'attachement comme pour le virus de la rougeole.

J'ai pu observer que lorsqu'on exprime l'éphrineB2-eGFP dans des cellules CHO, elle se répartie à la surface de la cellule et entraîne la formation de filopodes très longs et très ramifiés, comme cela avait déjà été observé dans le cadre de cellules murine B19 (Meyer2005), leur donnant une forme très étalée d'oeuf au plat. La co-expression avec la glycoprotéine G entraîne la formation de concentrations d'éphrineB2 à la surface ainsi que le

repli des filopodes sur ces concentrations. Les molécules d'éphrineB2 sont ensuite entraînées vers le centre de la cellule sous forme de vésicules de très grande taille (de un à plusieurs micromètres). Les vésicules formées en divers endroits de la cellule fusionnent alors les uns avec les autres pour ne former au final que deux vésicules géantes de part et d'autre du noyau. L'accumulation de matière autour du noyau donne souvent à la cellule une forme pyramidale. A noter que le mutant NiV-G E533Q (déficient pour la liaison avec l'éphrineB2) ne provoque pas ces changements.

### ***II-2-Co-endocytose de l'éphrineB2 et de la glycoprotéine G lors de contact par cellules opposantes***

Lorsque l'on co-cultive des CHO exprimant éphrineB2-eGFP et des CHO exprimant NiV-G, on obtient le même résultat : les filopodes entrant en contact avec NiV-G se rétractent, arrachant au passage un morceau de la membrane portant les glycoprotéines d'attachement. La vésicule ainsi formée à la base du filopode est ensuite internalisée et envoyée vers des vésicules géantes pour que son contenu y soit dégradé. Il arrive aussi que ce soit la membrane portant NiV-G qui arrache un bout de membrane éphrineB2-eGFP. Les images obtenues par microscopie confocale rappellent celles obtenues par d'autres groupes (Marston2003)(Zimmer2003) travaillant sur les interactions entre cellules éphrineB2+ et EphB4+.

### ***II-3-Localisation de la dégradation du complexe éphrineB2-glycoprotéine G***

Le signal de l'éphrineB2-eGFP reste ensuite localisé dans ces vésicules, et en moins de 24 heures il n'y a plus d'éphrineB2 membranaire. Le signal dans les vésicules diminue lui aussi en fonction du temps pour disparaître complètement. D'une manière intéressante, on observe exactement le même résultat en remplaçant la glycoprotéine G par EphB4-Fc. Ces résultats suggèrent que l'éphrineB2 est co-endocytosée avec la glycoprotéine G avant d'être dégradée.

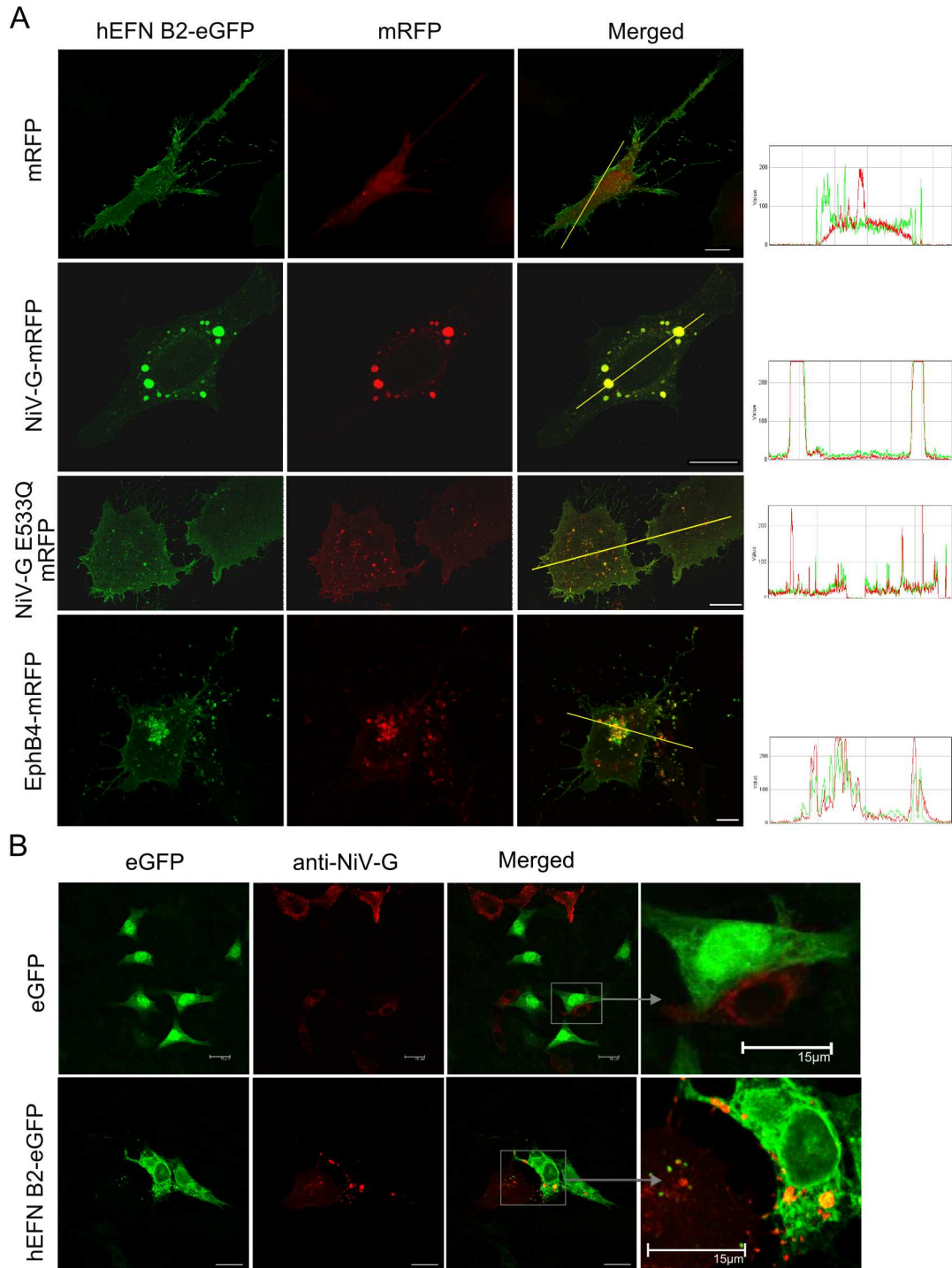


Figure 27 : La co-expression de NiV-G et d'éphrineB2 entraîne leur co-endocytose. A| Cellules CHO transfectées avec peGFP-NI-EFN B2 et soit un vecteur codant la RFP (pcDNA3,1-mRFP, première ligne), soit NiV-G-mRFP (seconde ligne), soit NiV-G E533Q (déficient pour la liaison avec éphrineB2, en troisième ligne) soit EphB4-mRFP (dernière ligne). NiV-G non muté et EphB4 induisent la co-endocytose. B| Le même phénomène est observé avec des cellules opposantes (Pernet2009).



C'est dans des vésicules géantes qu'a lieu la dégradation de l'éphrineB2. Grâce à une coloration au LysoTracker, un marqueur des lysosomes, on peut voir que ces vésicules géantes sont très acides. Autour d'elles, des lysosomes en grand nombre gravitent et fusionnent avec. Ces vésicules géantes sont donc issues de la fusion des endosomes contenant éphrineB2-eGFP avec des lysosomes, ce qui explique la dégradation observée d'éphrineB2. Des résultats similaires ont été obtenus en marquant les cellules avec un anticorps anti-Lmp1, un marqueur spécifique des lysosomes.

Ceci explique donc comment une cellule infectée ne puisse pas être sur-infectée, et pose une question quant à l'entrée du virus : en effet, si une membrane peut être arrachée d'une cellule et internalisée par ce phénomène, qu'en est-il d'une particule virale?

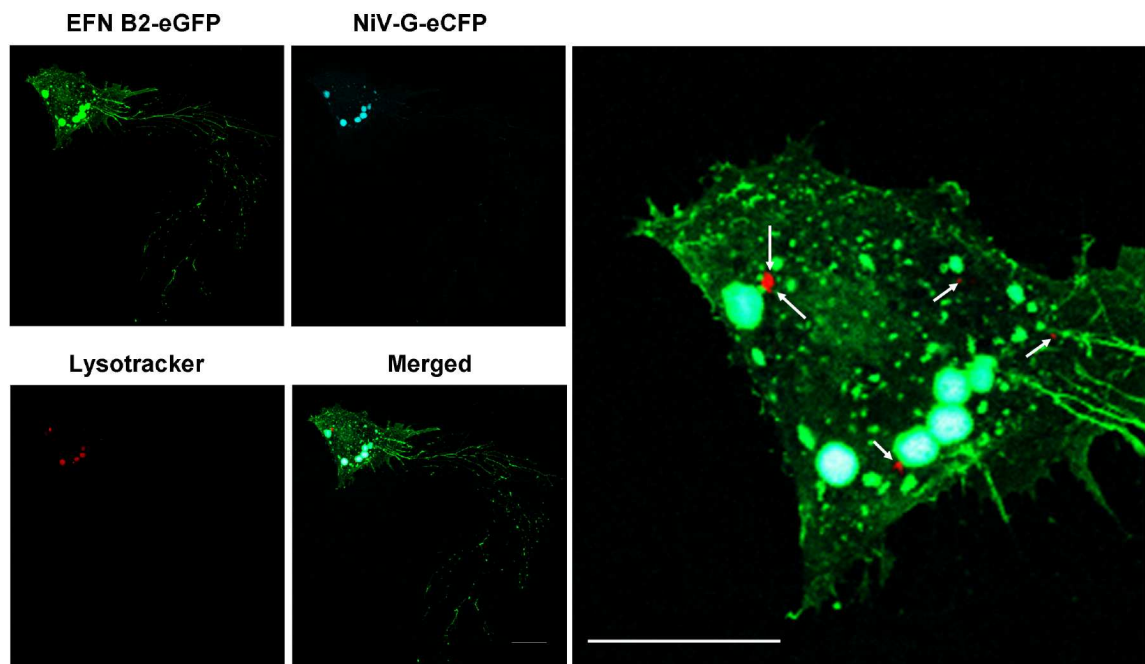


Figure 28 : Les endosome contenant éphrineB2 (en vert) et NiV-G (en bleu) sont envoyés vers des vésicules acides (en rouge) . Les lysosomes (flèches) fusionnent avec ces vésicules (Barre : 20 $\mu$ M)

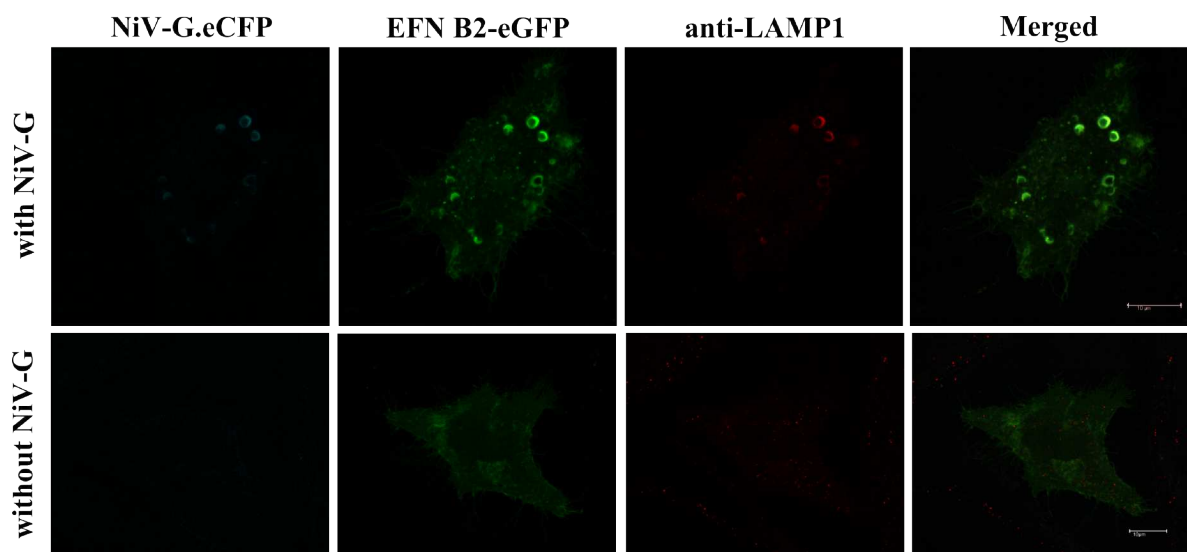


Figure 29 : La même expérience que la figure 28 mais avec un marquage anti-Lmp1 à la place du Lysotracker. Sur la ligne du bas, le contrôle sans NiV-G (Barre : 10 $\mu$ M) (Pernet2009)

## III-Un mécanisme d'entrée endocytique pour le virus

### Nipah

#### *III-1-Observations*

Ces résultats nous montrent que les cellules exprimant l'éphrineB2 peuvent co-endocytoser et dégrader des membranes portant la glycoprotéine G du virus Nipah. Serait-il possible que le virus puisse être internalisé de la sorte? Pour répondre à cette question, il a fallu mettre en place un nouveau protocole de coloration de particules virales (VLP). Les VLPs présentent deux avantages par rapport au virus : premièrement, elles peuvent être manipulées hors du laboratoire P4. Deuxièmement, on peut choisir quelle(s) protéine(s) virales(s) sera(ont) ou ne sera(ont) pas exprimée(s).

Des cellules CHO exprimant éphrineB2-eGFP ont donc été mises en contact avec différents types de VLP : certaines portent la glycoprotéine G, d'autres G, F et M, et enfin, l'Hémagglutinine du virus de la rougeole pour témoin. Après lavages et fixation, les VLPs ont été observées par microscopie confocale. Les particules exprimant G ont été retrouvées aux pieds des filopodes et dans des vésicules intracellulaires de grande taille, similaires à celles observées lors des expériences de transfection. En revanche, les particules exprimant H à la place de G n'ont pu être retrouvées nulle part : n'ayant pas de récepteur disponible à la surface des cellules (CD46 humain), elles ont été perdues avec les lavages.

#### *III-2-La glycoprotéine G mime la protéine EphB4*

##### ***Étude de l'interaction entre les domaines extra-cellulaires d'éphrineB2 et de la glycoprotéine G***

Les expériences précédentes ont toutes données des résultats rappelant ceux obtenus par les équipes travaillant avec EphB4, ce qui nous pousse à regarder d'un peu plus près les points communs entre cette protéine et la glycoprotéine G.

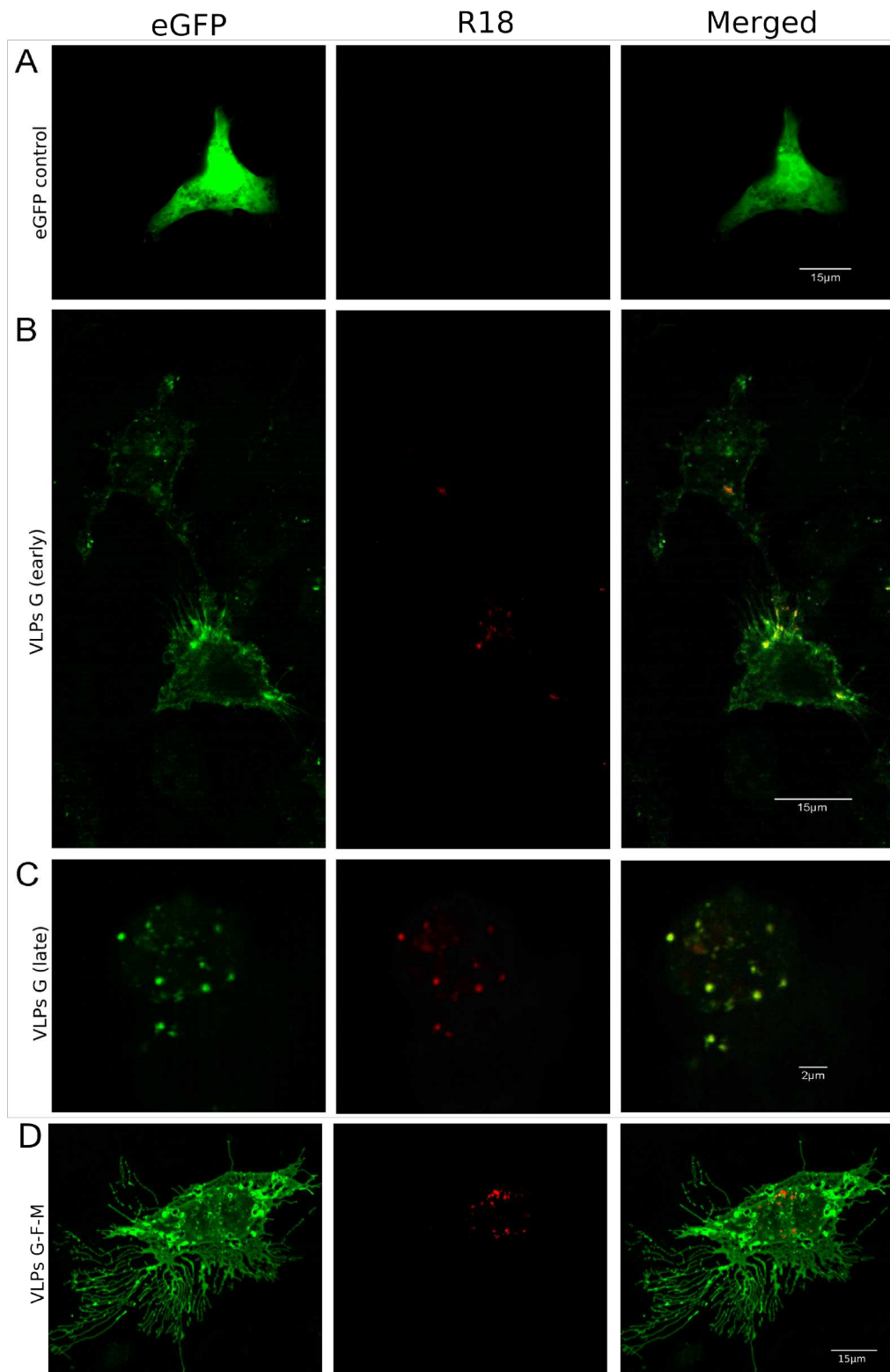


Figure 30: A| Les VLPs ne s'accrochent pas aux cellules sans récepteur. Ici, des CHO exprimant l'eGFP (en vert). B et C| Les cellules exprimant le récepteur (éphrineB2-eGFP, en vert) internalisent les VLPs portant la glycoprotéine G (en rouge). D| Même avec la glycoprotéine F, les VLPs sont internalisées (Barre : 15µM). (Pernet2009)

Dans le cadre d'une interaction entre éphrineB2 et EphB4, ce sont les acides aminés de la boucle G-H de l'éphrineB2 qui permettent la liaison avec EphB4 (Chrencik2006). Pour vérifier si cette boucle est aussi utilisée par le virus Nipah, j'ai testé des éphrineB2 mutées sur cette boucle G-H, et ce de deux manières :

- Transfection des plasmides codant les éphrinesB2 mutantes en CHO puis infection par le virus Nipah
- Co-transfection des plasmides codant les éphrinesB2 mutantes et de ceux codant les glycoprotéines de Nipah

Dans le premier cas, le virus n'arrive pas à entrer dans la cellule et ne peut donc pas former de syncytia. Dans le second, les glycoprotéines du virus sont exprimées par les cellules. Mais on n'observe pas ou peu de syncytia : les glycoprotéines virales ne reconnaissent plus, ou moins bien, les récepteurs mutés.

Dans les deux cas, les mutations sur les boucles limitent le développement des syncytia. De plus, les mutations ont des effets cumulatifs : en changeant tous les acides aminés de la boucle (sur les acides aminés FNWL120/123/125/127AAAA), on n'obtient aucun syncytia. L'éphrineB2 est alors inutilisable pour le virus. Ces acides aminés de la boucle G-H sont ceux utilisés à la fois par EphB4 et la glycoprotéine G pour reconnaître éphrineB2. Une étude par cristallographie du virus Nipah a confirmé que la même boucle G-H est impliquée dans la reconnaissance de la glycoprotéine d'attachement G (Bowden2008.)

### ***Conséquence de l'attachement de la glycoprotéine G sur la queue cytoplasmique d'éphrineB2***

La glycoprotéine d'attachement G semble se comporter comme EphB4 pour reconnaître éphrineB2. L'étape suivante de cette étude fut de vérifier si les conséquences d'une liaison avec la glycoprotéine G était les mêmes qu'avec le ligand naturel EphB4. L'interaction avec EphB4 entraîne une signalisation bi-directionnelle. Ce signal se traduit par la phosphorylation d'éphrineB2 au niveau de la queue cytoplasmique. Il y a 11 tyrosines dans la queue de l'éphrineB2, mais seules les tyrosines 304 (et dans une moindre mesure 330

et 331) sont importantes pour la transduction du signal EphB4 (Su2004).

J'ai donc mené des expériences comparables à celles décrites au paragraphe précédent, mais en mutant cette fois-ci les tyrosines cytoplasmiques d'éphrineB2. Plus efficace que toutes les autres, la simple mutation Y304F bloque la quasi-totalité des entrées virales. La délétion complète du domaine cytoplasmique de l'éphrineB2 donne les mêmes résultats. D'une manière intéressante, l'effet sur la formation de syncytia (testé par co-transfection des glycoprotéines virales et des éphrineB2 mutées) est nulle. Seul le domaine extra-cellulaire semble requis pour la formation des syncytia. Comme nous l'avons vu précédemment, c'est cette même tyrosine qui transmet le signal lors d'une liaison avec EphB4.

Ces résultats suggèrent que le mimétisme de la glycoprotéine G va au-delà de la simple liaison à l'éphrineB2. La fixation sur la même boucle par les mêmes résidus entraîne les mêmes effets sur la signalisation intra-cellulaire : la glycoprotéine G peut donc déclencher les mêmes réactions cellulaires que EphB4, à savoir l'endocytose de larges vésicules contenant éphrineB2 et tout ce qui y est accroché. Le virus peut ainsi entrer par endocytose.

### ***III-3-Le signal émis par l'éphrineB2 suivant l'attachement de la glycoprotéine G et son inhibition***

#### ***Effet de la génistéine sur l'entrée du virus Nipah***

Le signal émis par l'éphrineB2 se transmet dans la cellule par une cascade de kinases. Un inhibiteur efficace et spécifique des tyrosines kinases est la génistéine. La génistéine est un isoflavone naturel (4',5,7-Trihydroxyisoflavone), présent notamment dans le soja (*Glycine max*). J'ai donc utilisé la génistéine (50 $\mu$ M) lors d'infection de cellules Vero par le virus Nipah. Les cellules traitées ont montré un nombre de foyers infectieux significativement inférieur aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent qu'en bloquant les cascades de kinase, on peut bloquer partiellement l'entrée du virus.

Afin de vérifier que l'entrée, et seulement l'entrée, est affectée par la génistéine, j'ai réalisé une expérience similaire à la précédente, mais en transfectant les cellules Vero avec des plasmides codant les glycoprotéines de Nipah au lieu de les infecter.

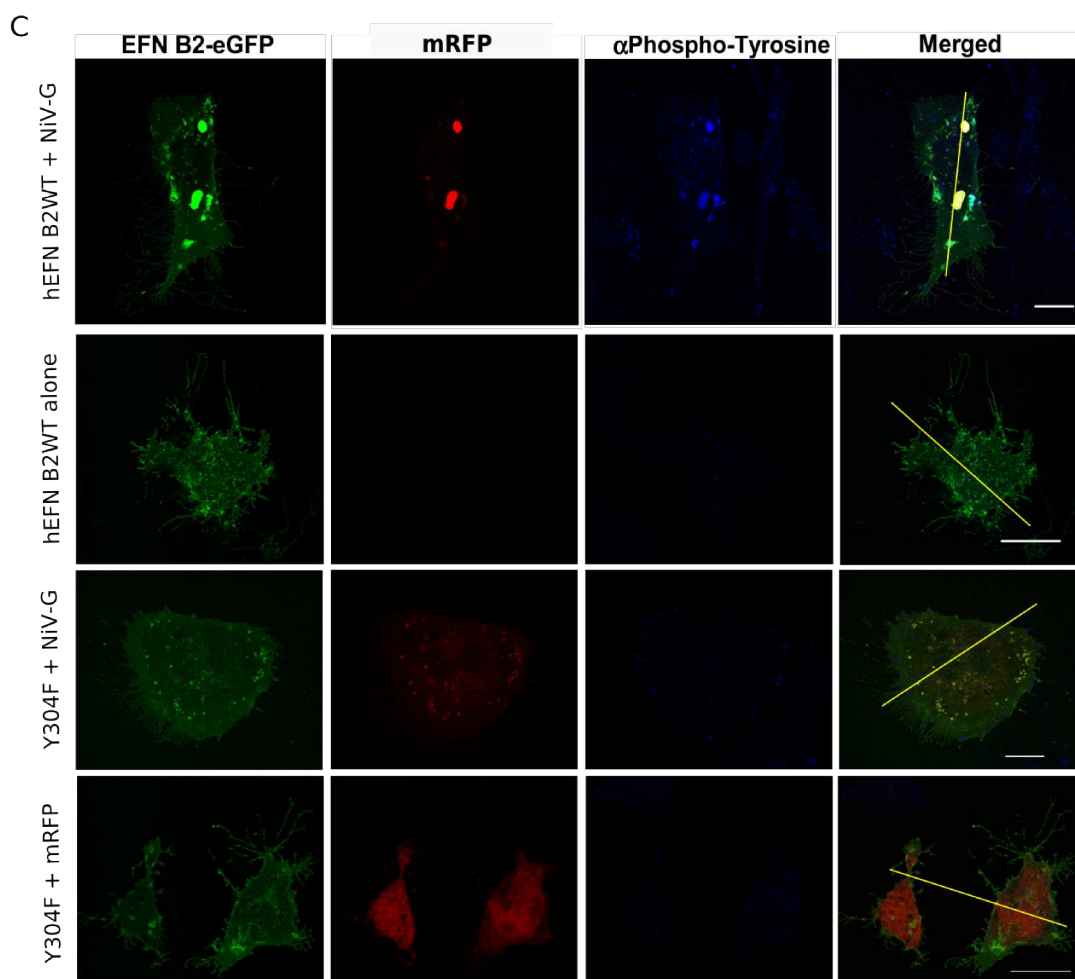
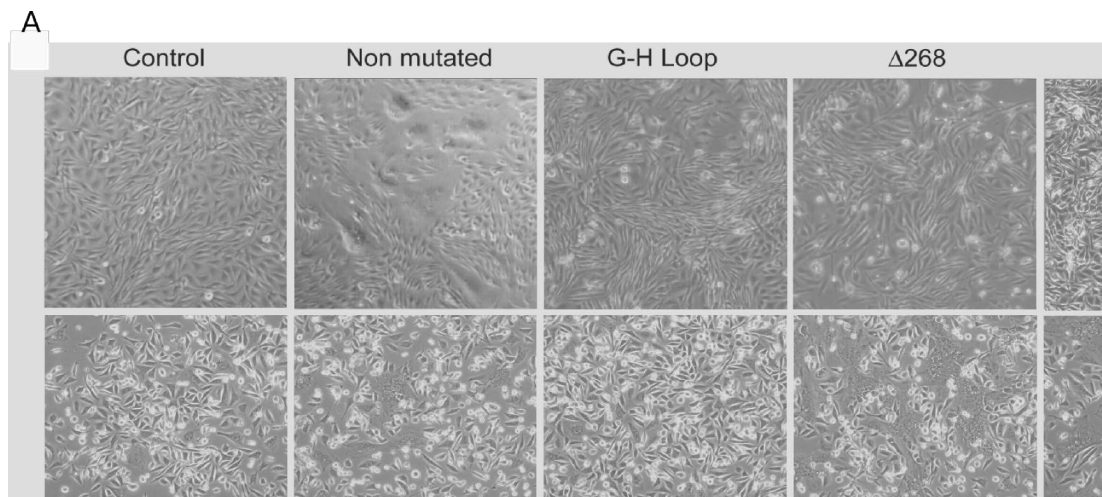


Figure 31 : A| Ligne du haut : infection par le virus Nipah de cellules CHO exprimant différents mutants d'éphrineB2. Ligne du bas : cellules CHO exprimant ces mêmes mutants et co-transfectées avec les plasmides codant les glycoprotéines virales. B| Quantification de la partie A (Pernet2009).

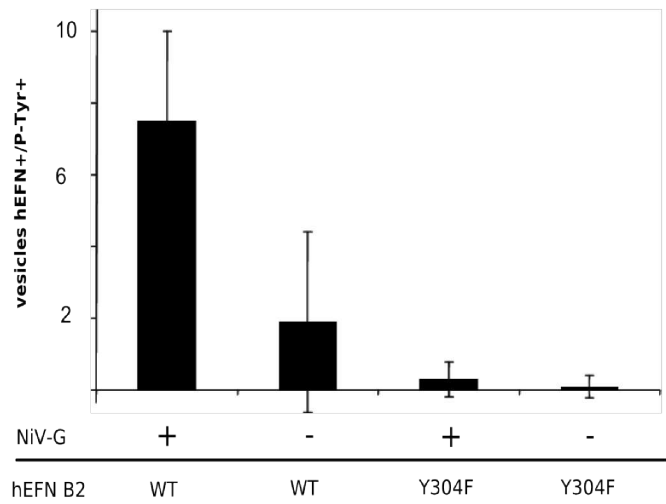
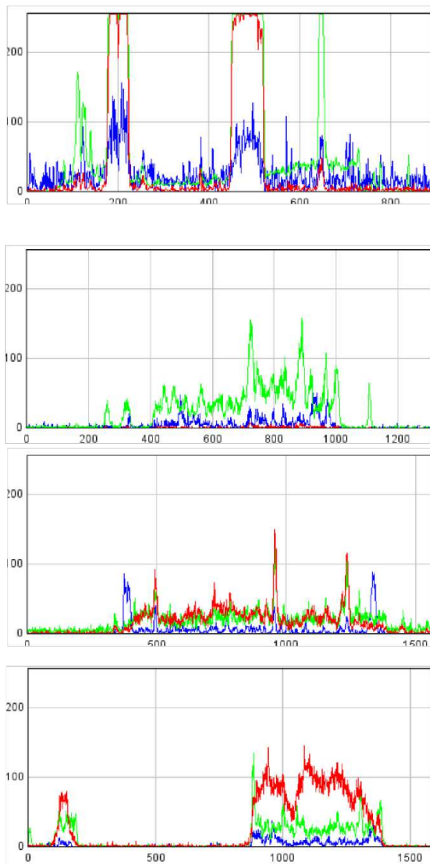
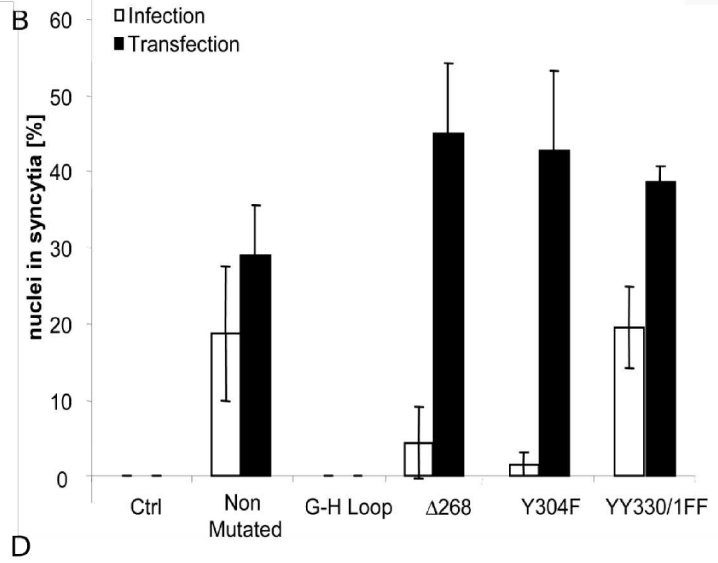
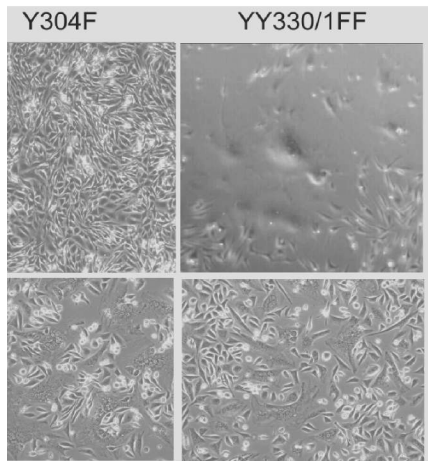


Figure 31 suite : C| Marquage en immuno-fluorescence des tyrosines phosphorylées lors de co-transfection de vecteur codant des mutants d'éphrineB2 avec la glycoprotéine G (Barre : 15 $\mu$ M). D| Quantification des vésicules éphrineB2+/phosphotyrosine+ lors de marquage type C.(Pernet2009)



La formation de syncytia n'a pas été affectée par la présence des mêmes concentrations de génistéine. On peut ainsi affirmer que la perturbation des signaux des tyrosines kinases par la génistéine bloque l'entrée du virus mais pas la production ni l'activité des glycoprotéines virales.

### ***Rôle dans l'entrée du virus Nipah des PI3Ks et leurs inhibitions***

Un autre inhibiteur efficace avec le protocole expliqué ci-dessus est la Wortmanin. La Wortmanin est issue d'un champignon (*Penicillium funiculosum*). Cette molécule de la famille des furanostéroïdes se lie covalamment aux Phosphoinositide-3-Kinases (PI3Ks), ce qui inhibe leurs activités.

Nous avons montré que l'utilisation de 50nM de cet inhibiteur permet une réduction de 65% des entrées virales. Et comme précédemment, aucun effet sur la production ou l'activité des glycoprotéines du virus Nipah *in vitro* n'a pu être observé. De plus, 100µM de LY294002, un autre inhibiteur des PI3Ks connu pour être un peu moins efficace que la Wortmanin, inhibe de 48% l'entrée du virus. L'entrée du virus Nipah, en particulier la transmission du signal d'internalisation, est donc dépendante des PI3K.

### ***Les mouvements membranaires liés au signal d'activation***

Les mouvements de la membrane cellulaire observés lors de l'internalisation des particules virales sont toujours les mêmes : effondrement des filopodes sur la membrane, formant ainsi une bulle qui est internalisée. Les molécules généralement associées à ces mouvements sont des RhoGTPases nommées Rac1, Cdc42, ou RhoA selon les cas. Ces régulateurs du cytosquelette d'actine sont très étudiés en biologie cellulaire, et on leur connaît depuis longtemps des mutants dominants négatifs et dominants positifs. Les plasmides codant ces mutants étant disponibles sur l'IFR, j'ai pu tester leurs effets sur l'entrée du virus.

En infectant des cellules transfectées avec ces dominants négatifs (N17Rac1, N17Cdc42 ou N19RhoA) ou des plasmides contrôles, j'ai pu constater que Rac1 et Cdc42 jouait un rôle primordial dans l'entrée du virus. Près de 50% des syncytia était évités parmi les cellules transfectées avec un des dominants négatifs, et comme précédemment il n'y avait aucun effet sur l'expression ou la fonctionnalité des glycoprotéines virales. En revanche, RhoA ne semble avoir aucun effet, aucun rôle dans l'entrée du virus. Ses mutants sont sans effet sur les formations des syncytia.

### ***Effet de la Toxine B sur l'entrée du virus Nipah***

Les régulateurs du cytosquelette étudiés au paragraphe précédent ont un inhibiteur naturel. Il s'agit de la Toxine B de la bactérie *Clostridium difficile*. Cette cytotoxine est une glucosyltransférase qui inactive les RhoGTPase. On peut donc l'utiliser pour démontrer un rôle (ou non) des RhoGTPases dans l'entrée du virus, et ce de la même façon qu'avec la wortmanin ou la génistéine.

Les résultats obtenus sont du même ordre que ceux obtenu avec les dominants négatifs : environ 50% de réduction du nombre d'entrées virales pour 80µM de Toxine B. Cependant, la toxicité de cette molécule ne permet pas d'utiliser des doses plus élevées.

### ***Effets des inhibiteurs du cytosquelette sur l'entrée du virus***

Comme nous l'avons vu dans un chapitre précédent, les réorganisations du cytosquelette d'actine permettent les mouvements cellulaires et sont donc probablement très importantes pour l'entrée du virus Nipah. Les protéines du cytosquelette impliquées dans ces mouvements sont l'actine et la myosine. Plusieurs inhibiteurs peuvent être utilisés pour vérifier l'importance de ces protéines dans l'entrée du virus Nipah. Parmi eux, on trouve la Latrunculine A et la Blebbistatine.

La Latrunculine A est une toxine naturellement produite par les éponges du genre *Latrunculia*. Cette toxine se fixe sur les monomères d'actine et empêche la formation de nouveaux filaments. Nous avons montré que si l'on infecte des cellules Vero en présence de 2 $\mu$ M de Latrunculine A, plus de 80% des des entrées virales dans les cellules hôtes sont inhibées. De plus, les expériences de transfection ont montré qu'elle n'inhibe en rien la production ou les fonctions des glycoprotéines virales et plus généralement les étapes suivant l'entrée.

La Blebbistatine agit en diminuant l'affinité de la myosine IIA et l'actine, et bloque ainsi l'entrée cellulaire de plus de 50% des virus. La Blebbistatine tient son nom du bourgeonnement membranaire qu'elle inhibe : le *bleb*. Le bleb est le nom anglais d'une déformation de la membrane observée lors de phénomènes tels que l'apoptose ou la macropinocytose (Mercer2009).

### ***Le mécanisme endocytique d'entrée utilisé par le virus Nipah est la macropinocytose***

Tous les éléments de signalisation décrits jusque-là sont les éléments clefs des régulations des mouvements membranaires, en particulier ceux conduisant à la macropinocytose. On retrouve l'activation d'un récepteur tyrosine kinase, les cascades de réactions conduisant à la PI3K, les éléments Cdc42/Rac1 (mais pas RhoA) et enfin les réorganisations du cytosquelette dépendantes de la Myosine II.

De plus, les inhibiteurs ne bloquent pas 100% du phénomène, ce qui fait penser à un mécanisme dont les voies de signalisation sont redondantes.

Tous les éléments sont là pour suspecter une entrée du virus par macropinocytose, d'autant plus que cela concorde avec la taille observée des vésicules internalisant les particules virales ou ses glycoprotéines (plus de 0,5 $\mu$ M). Tous les critères observés correspondent à ceux nécessaires pour qualifier une endocytose de macropinocytose selon Mercer et Helenius (Mercer2009). On peut alors étendre notre étude à l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de la macropinocytose comme inhibiteurs d'entrée du virus.

Critères	Inhibiteur(s)
Reflux membranaire ou <i>bleb</i>	Blebbistatine
Réorganisation de l'actine	Latrunculine, cytochalasine B/D ou Jaspakinolide
Rac1/Cdc42	ToxineB, mutants N17
Échangeurs Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	Amiloride, EIPA
Kinases	Wortmannin, LY294002, bisindolylmaleimide ou rottlerin
Internalisation du milieu extérieur	

Figure 32 - Tableau des critères définissant la macropinocytose selon Mercer et Helenius, 2009 (Mercer2009)

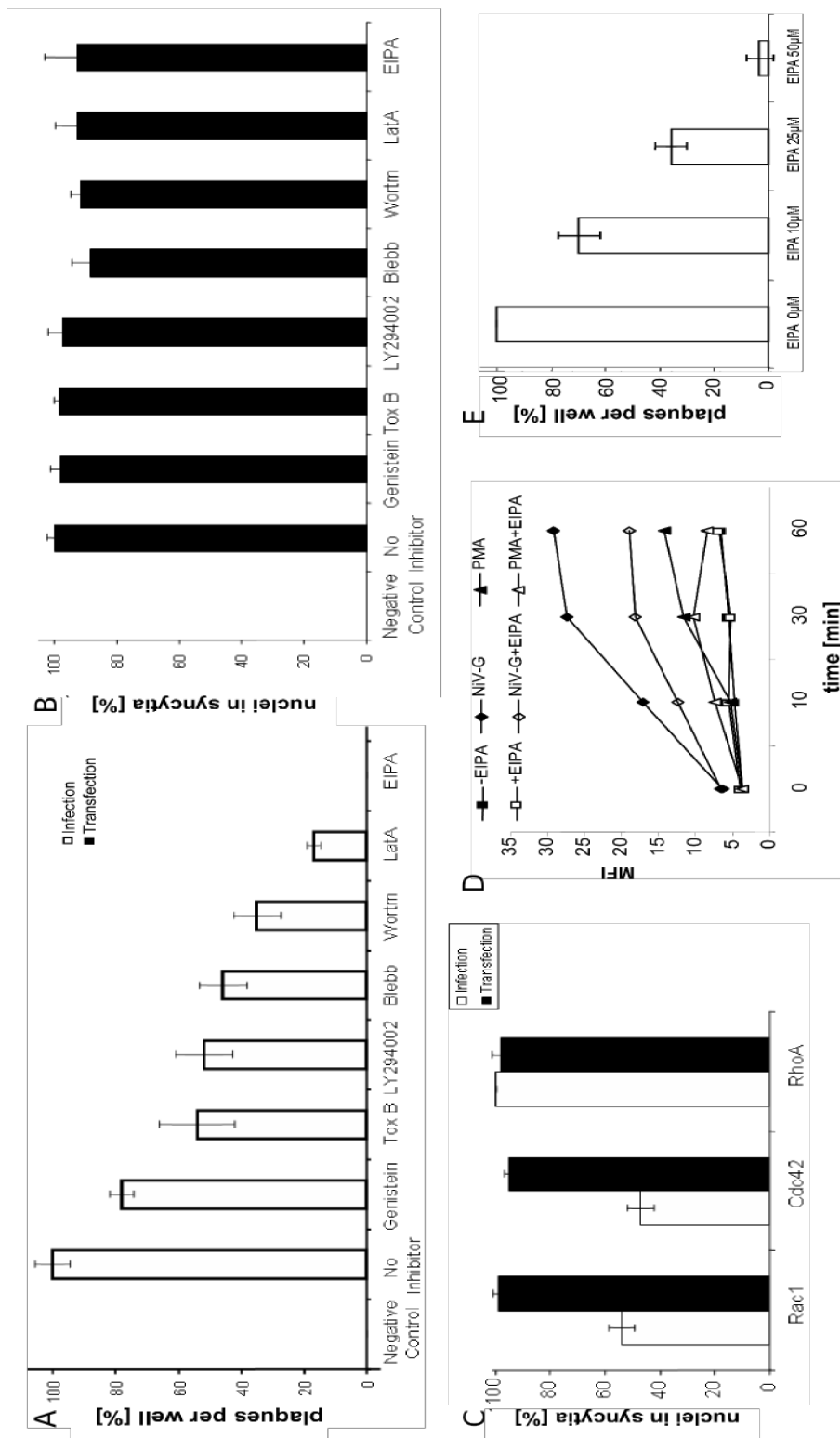


Figure 33 : A| Inhibition de l'infection de cellules Vero par le virus Nipah avec différentes molécules : génistéine, toxine B, LY294002, Blebbistatine, Wortmanin, Latrunculine A et EIPA. B| Expérience contrôle par transfection de plasmides codant les glycoprotéines virales. C| Effet des dominants négatifs de Rac1, Cdc42 et RhoA sur l'infection par le virus (en blanc) par rapport aux transfections de plasmides codant les glycoprotéines virales contrôles (noir) D| Effet de l'EIPA sur l'activité macropinocytique par quantification de dextran-FITC internalisé. E| Effet dose de l'EIPA sur l'infection de Vero par le virus Nipah (Pernet2009)

## IV-Les inhibiteurs des infections hénipavirales

### *IV-1-Inhibition de l'entrée du virus Nipah in vitro*

#### **Réflexion générale**

Les inhibiteurs utilisés jusqu'à présent n'étaient pas spécifiques de la macropinocytose. Cependant, de tels inhibiteurs existent. L'un d'entre-eux est l'amiloride qui bloque les échangeurs Proton / Sodium (West1989). Nous pouvons donc essayer d'utiliser cet inhibiteur ou son analogue EIPA pour bloquer l'entrée du virus Nipah par macropinocytose. De plus, le virus Nipah a d'autres points faibles. Ainsi, le clivage de sa protéine F dépend d'une enzyme, la cathepsine L, qui ne fonctionne qu'à pH bas. En relevant le pH des vésicules intra-cellulaires avec une base douce, on pourrait bloquer la maturation de la glycoprotéine F et donc son activité fonctionnelle. On bloquerait par la même occasion la downregulation de l'éphrineB2. Ces deux axes permettraient de bloquer les activités de chacune des glycoprotéines du virus.

#### **L'amiloride**

Nous avons précédemment passé en revue l'amiloride et ses analogues. J'ai donc utilisé l'EIPA comme inhibiteur de l'entrée lors d'une infection de cellules Vero par le virus Nipah. Les résultats montrent qu'en bloquant la macropinocytose avec de l'EIPA, on bloque l'entrée du virus Nipah. L'effet est dépendant de la dose utilisée : 10 $\mu$ M inhibe 25% de l'infection, 25 $\mu$ M bloque 50% des virus et 50 $\mu$ M bloque quasiment toute entrée cellulaire. Les quelques syncytia présents lors d'infection en présence d'amiloride ne diffèrent pas de ceux obtenus en milieu contrôle. De plus, comme pour la génistéine et les autres inhibiteurs déjà testés, une expérience contrôle a été réalisée avec des cellules transfectées par les plasmides codant les glycoprotéines G et F. Les résultats sont les mêmes : l'amiloride ne bloque que l'entrée, et pas les phénomènes d'étalement ni la maturation des glycoprotéines.

Il est intéressant de noter que les résultats obtenus avec le virus Hendra sont identiques. L'amiloride étant déjà utilisé en médecine, cette drogue est un bon candidat pour la préparation d'un traitement *in vivo*.

### ***La chloroquine***

Comme nous l'avons vu dans un précédent chapitre, la chloroquine est une base faible qui se concentre dans les lysosomes (et les endosomes tardifs) et augmente ainsi leurs pH. En augmentant le pH, elle bloque l'activité de la cathepsine L et donc empêche le clivage de la glycoprotéine F. J'ai donc testé l'efficacité de la chloroquine lors d'infections par le virus Nipah ou Hendra. Les résultats obtenus montrent une forte inhibition du virus Nipah : la taille des syncytia diminue en fonction de la concentration. Une concentration de 50 $\mu$ M est suffisante pour empêcher l'apparition de tout syncytia. Cependant, le virus mature est toujours capable d'infecter les cellules. L'entrée du virus est donc toujours possible comme le montre les immunomarquages réalisés sur des cellules infectées en présence de chloroquine. La chloroquine ne bloque donc que l'étalement, et pas l'entrée des Henipavirus.

Si on veut utiliser la chloroquine en traitement, il faudrait une concentration sanguine d'au moins 30  $\mu$ M. Sachant que 25 $\mu$ M est une dose mortelle pour l'homme, il faut trouver une alternative. L'hydroxychloroquine est un analogue moins toxique que nous avons déjà évoqué. Sa capacité à bloquer l'étalement de l'infection par le virus Nipah est donc déterminée selon le même protocole que la chloroquine. Les résultats sont absolument identiques. L'hydroxychloroquine est donc une alternative moins toxique et tout aussi efficace contre le virus Nipah.

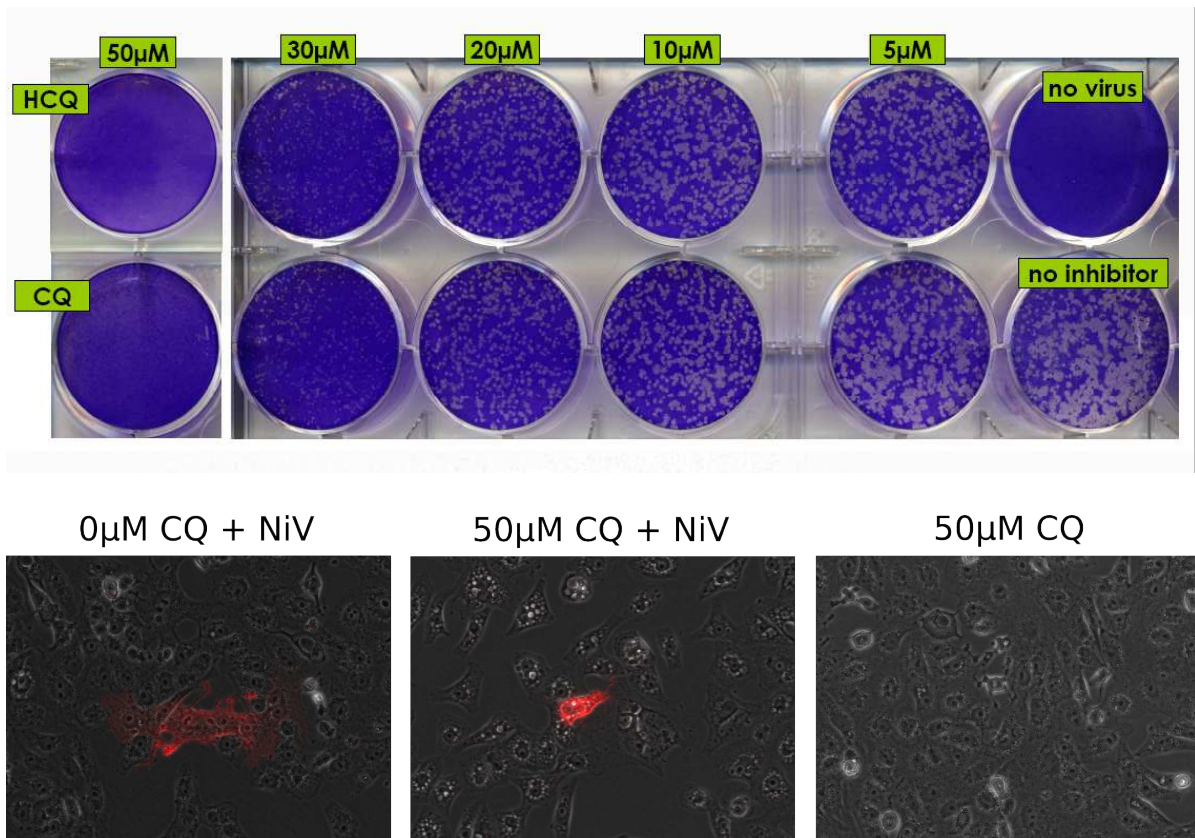


Figure 34 : En haut : Effet dose de la chloroquine (CQ) et de l'hydroxychloroquine (HCQ) contre le virus Nipah pour différentes concentrations. Les deux molécules agissent de même. En bas : immuno-marquage anti-Nipah après infection de cellules Vero en présence de 50µM de chloroquine. La chloroquine bloque la formation de syncytia (dispersion/étalement) mais pas l'entrée du virus.(Pernet2009)



## ***IV-2-Inhibition de l'entrée du virus in vivo : le hamster doré comme modèle animal***

### **Traitements**

Les travaux d'inhibitions cités ci-avant pose la question d'un traitement pour l'humain. Certains des inhibiteurs en question sont déjà utilisés en médecine (amiloride, chloroquine et hydroxychloroquine). Leur efficacité est donc maintenant à vérifier *in vivo*. Pour cela, on utilise le modèle hamster. Les animaux de 7 à 8 semaines sont hébergés dans notre animalerie P4 (A4). Ainsi, ont été testés :

- Chloroquine 500mg/kg/jour
- Chloroquine 250mg/kg/jour
- Chloroquine 500mg/kg/jour + Diazepam
- Chloroquine 500mg/kg/jour + Amiloride
- Chloroquine 250mg/kg/jour + Amiloride
- Témoin positif (Infecté et non traité)
- Témoin négatif (Non infecté)

Les drogues utilisées sont solubilisées dans l'eau de boisson, pour un volume correspondant à 20mL par hamster et par jour. Les hamsters ainsi traités on été infectés à J+3 avec 50 pfu de virus Nipah, souche malaisienne (soit entre 7 et 8 doses létales 50, ou LD<sub>50</sub>, de notre souche virale). Les animaux ont ensuite été observés pendant 3 semaines.

## ***Effets de la chloroquine et de l'amiloride in vivo***

Bien qu'il s'agisse de résultats encore préliminaires, ce sont des résultats encourageants. Une diminution de la mortalité a été observée chez les animaux ayant reçu 500mg/kg/j en combinaison avec l'amiloride. 50% des animaux ainsi traités ont survécu à un challenge qui aurait dû tous les tuer (7 à 8 LD<sub>50</sub>). Mais les concentrations utilisées lors de cette expérience sont excessivement élevées. La composition du traitement doit encore être affinée et les expériences sur hamster renouvelées.

L'étude de la downrégulation a permis de montrer que la glycoprotéine G du virus Nipah mime le récepteur naturel EphB4 et induit les mêmes mouvements membranaires. Ces mouvements sont utilisés par les virions pour pénétrer dans la cellule, par co-endocytose avec éphrineB2. Cette co-endocytose est plus précisément une « macropinocytose induite par l'activation d'un récepteur ». En inhibant cette macropinocytose à différents niveaux du phénomène, on peut bloquer plus ou moins efficacement l'entrée du virus. Transposées à l'animal, ces observations se confirment et ouvrent la voie à un traitement thérapeutique bon marché.

## **V-Rôle de la queue cytoplasmique de la glycoprotéine G dans l'entrée et la dispersion du virus Nipah**

### ***V-1-Hypothèse de travail***

Les résultats précédents ont mis en évidence que le virus Nipah entre par macropinocytose. Il y a donc une dichotomie dans les conséquences de la reconnaissance de l'éphrineB2 par la glycoprotéine G. Le premier cas mène à l'entrée par macropinocytose. Le second cas est le plus généralement et le plus facilement observé : il s'agit des fusions cellule-cellules, c'est-à-dire la formation de syncytia. Comment se fait-il que les mêmes interactions entre éphrineB2 et la glycoprotéine G puissent provoquer deux conséquences différentes? Pourquoi le virus n'entre-t-il pas à la surface par fusion avec la membrane

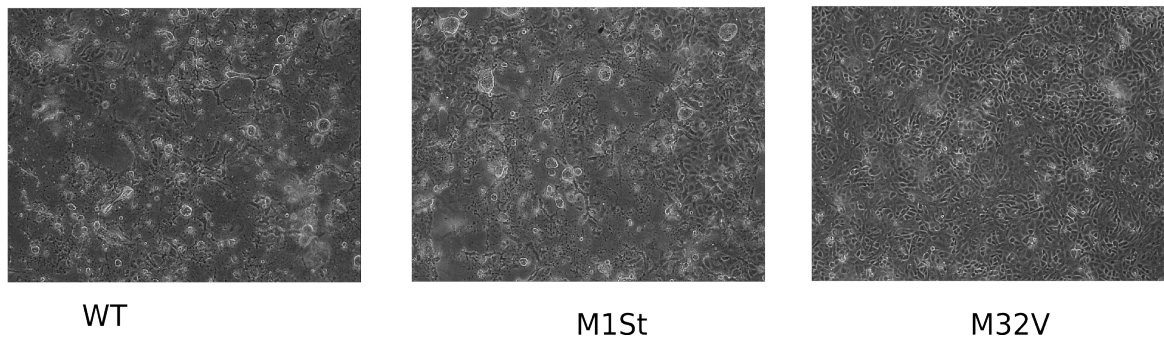
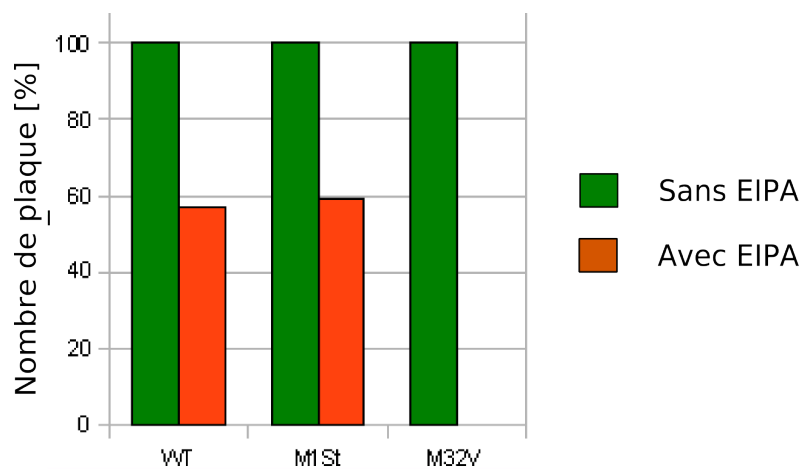
plasmique? Une explication possible à cette énigme pourrait être que la macropinocytose est un phénomène beaucoup plus rapide que la fusion. Une autre pourrait être qu'il y a deux conformations différentes pour la glycoprotéine G : une pour l'entrée par macropinocytose, l'autre pour l'étalement du virus.

En examinant la séquence primaire de la queue cytoplasmique de la glycoprotéine G, nous avons remarqué qu'elle possède une deuxième méthionine dont la séquence ARN se trouve dans un contexte de Kozak favorable et dans le même cadre de lecture que le codon initiateur M1. Il s'agit de la Méthionine 32. On sait qu'il y a une interaction entre la queue cytoplasmique de la glycoprotéine G et la protéine M qui conditionne le bourgeonnement. Les glycoprotéines G qui commencent à la deuxième méthionine ne pourraient donc pas interagir avec la protéine M et donc ne seraient pas incorporées par les virions. Sa présence en revanche permet l'étalement du virus par syncytia.

Pour déterminer un éventuel rôle à ces deux isoformes et vérifier les hypothèses ci-dessus, nous avons modifié par mutagenèse dirigée les séquences codantes de la queue cytoplasmique de la glycoprotéine G du virus Nipah. Nous avons collaboré avec l'équipe de Viktor Volchkov (Inserm U758-Filovirus) qui, via un système de génétique inverse, a pu insérer les séquences mutées dans le génome viral et produire ainsi des virus recombinants exprimant exclusivement une forme ou l'autre. De cette façon, un virus recombinant portant la mutation M32V exprimera exclusivement la forme longue de la glycoprotéine G. Et un virus recombinant M1Stop n'exprimera que la version courte. Ces virus produits, j'ai pu tester leurs effets sur des cellules Vero.

### ***V-2-Effets des mutations de la queue cytoplasmique sur l'entrée des virus recombinants***

La première différence observable, c'est la différence de taille des syncytia : en 36 heures les virus M32V (version longue) produisent de plus petits syncytia de seulement quelques cellules, alors que dans le même temps, M1Stop et le virus sauvage ont détruit presque tout le tapis cellulaire. De plus, les virus M32V se sont révélés être extrêmement sensibles à l'amiloride (2 à 3 fois plus que les sauvages), alors que le M1Stop n'a pas montré de différence significative avec la souche sauvage. De manière intéressante, les observations



Nom	Queue Cyto	Syncytia	Amiloride	Time Lapse
WT	Sauvage	Grands	Sensible 100% inhib @ ~50µM	Macropinocytose
M1Stop	Courte	Grands	Sensible	Fusion surface
M32V	Longue	Petits	Très sensible 100% inhib @ ~25µM	Macropinocytose très rapidement

Figure 35 : En haut, le virus recombinant M32V est plus sensible à l'amiloride : 25µM d'EIPA ont inhibé 100% des syncytia, alors que (comme nous l'avons vu précédemment) seulement 50% des syncytia avec le virus sauvage. Au centre : syncytia 72h post-infection. Le M1St produit de très grand syncytia sur les cellules Vero, alors que seules quelques cellules ont fusionné avec le M32V. En bas, tableau récapitulatif des particularités de chaque virus.

en Time Lapse ont montré que les virus M32V entrent très rapidement (en quelques minutes, plus rapidement que le virus sauvage) par endocytose , alors que les virus M1St fusionnent à la membrane plasmique.

Alors que les glycoprotéines G à courte queue favorisent une fusion à la membrane plasmique et de très grands syncytia, les M32V (longue queue) favorisent une entrée rapide par macropinocytoses et des syncytia limités. Voilà des résultats qui expliqueraient le paradoxe des deux différents effets : entrée par macropinocytose et formation de syncytia (étalement du virus). L'une, favorisée par les glycoprotéines à longue queue et dépendante de la queue cytoplasmique de l'éphrineB2, et l'autre favorisée par les glycoprotéines à courte queue et indépendante de la queue cytoplasmique de l'éphrineB2, permettent d'expliquer cette énigme.

*(Un article présentant ces résultats est en préparation)*

Maintenant que nous avons longuement parlé de l'entrée du virus, intéressons-nous à la formation des syncytia. Nous avons déjà vu qu'il ne dépendait que de la présence du domaine extra-cellulaire de l'éphrineB2 au niveau de la membrane cellulaire. Voyons ce qu'il en est au niveau de la membrane virale.

## VI-Identification du domaine d'interaction de F avec G

### *VI-1-Hypothèse de travail*

Lors de la formation des syncytia, la glycoprotéine F ne peut exercer son rôle fusogène que si la glycoprotéine G est présente à ses cotés ce qui suggère une interaction physique entre les deux protéines. Le but de cette étude est de découvrir le ou les domaines d'interaction de F avec G. Pour cela, on utilise la mutagenèse dirigée sur un vecteur d'expression de la protéine F. Le principal avantage de cette méthode réside dans la simplicité de l'obtention des résultats. Des cellules exprimant le récepteur du virus (par exemple les cellules Vero) transfectées avec les vecteurs d'expression codant les glycoprotéines F et G forment rapidement des syncytia caractéristiques. Une mutation critique empêcherait la formation de ces syncytia. Cette méthode a déjà permis de mettre en évidence les rôles du domaine cytoplasmique ou de la boucle G-H dans les mécanismes de fusion de membranes, et de déterminer le domaine de la glycoprotéine G interagissant avec le récepteur cellulaire du virus (Guillaume2006)(Thèse de Hamide Aslan, 2007)

En raison de leur importance dans les interactions des glycoprotéines homologues chez les Morbillivirus, les petites boucles formées par les ponts di-sulfures ont été particulièrement visées dans cette étude. En effet, notre équipe a montré que l'échange des petites boucles de la région riche en cystéine de la glycoprotéine F du virus de la rougeole avec celle du virus de la maladie de Carré (CDV) permettait à la glycoprotéine F du CDV d'interagir avec la glycoprotéine H du virus de la rougeole, alors que les interactions hétérotypiques sont impossibles chez les Morbillivirus (Wild1994).

Ce n'est cependant pas le cas des Henipavirus. En effet les glycoprotéines F et G du virus Nipah et du virus Hendra peuvent provoquer la fusion de membranes même lors d'associations hétérotypiques. Or, la région des ponts di-sulfures de glycoprotéine F est particulièrement conservée chez les Hénipavirus.

Nous avons vu dans un chapitre précédent que pour la glycoprotéine G, le domaine 203ISYTLPVVG211 est déterminant. Pour ce qui est du domaine d'interaction sur la glycoprotéine F, le domaine riche en cystéine est une cible intéressante. Plus précisément, les petites boucles peuvent facilement entrer dans des poches situées sur la glycoprotéine G et jouer le rôle de domaine d'interactions.

Plus précisément, nous avons choisi de muter à l'intérieur des boucles, ce qui évite que les mutations changent la conformation de la protéine. Nous avons introduit par mutagenèse dirigée dans ces boucles des tours  $\beta$ , au niveau des acides aminés KR335/6GP et S359P. Ces tours  $\beta$  perturbent la structure 3D des boucles (qui ne peuvent plus entrer dans les poches) mais pas celle de la protéine. Les plasmides codant ces mutants ont ensuite été co-transfectés avec pCMV-NiG dans des cellules Vero et analysés en immunofluorescence avec un anticorps anti-F et un anticorps secondaire couplé à la FITC, ainsi qu'en culture cellulaire.

### ***VI-2-Effet des mutations dans le domaine riche en cystéines de la glycoprotéine F sur l'interactions avec la glycoprotéines G***

#### ***Résultats des tests de fusion***

Les différentes mutations introduites dans la séquence codante la glycoprotéine F ne change en rien son expression. C'est une expression forte et utilisable pour les tests de fusion sur cellules Vero.

Lors de co-transfection avec la glycoprotéine G, on observe l'apparition de nombreux syncytia avec le contrôle positif, c'est-à-dire lorsque la glycoprotéine F n'est pas mutée. Cependant, les mutants des boucles cystéines montre une activité de fusion moins efficace, voire inefficace. Alors que les cellules transfectées avec les glycoprotéines F et G sauvages sont à plus de 50% sous forme de syncytia, seules quelques cellules fusionnent avec le mutant KR335/6PG, et aucune ni pour le mutant S359P ni pour la version mutée sur les deux boucles. Cette expérience suggère que des boucles cystéines jouent un rôle dans les interactions entre les glycoprotéines F et G.

#### ***Résultats des expériences de co-immunoprécipitation***

Les études de co-immunoprécipitation ont montré que les glycoprotéines F et G des Henipavirus étaient fortement liées. Diverses combinaisons hétérotypiques (entre Nipah

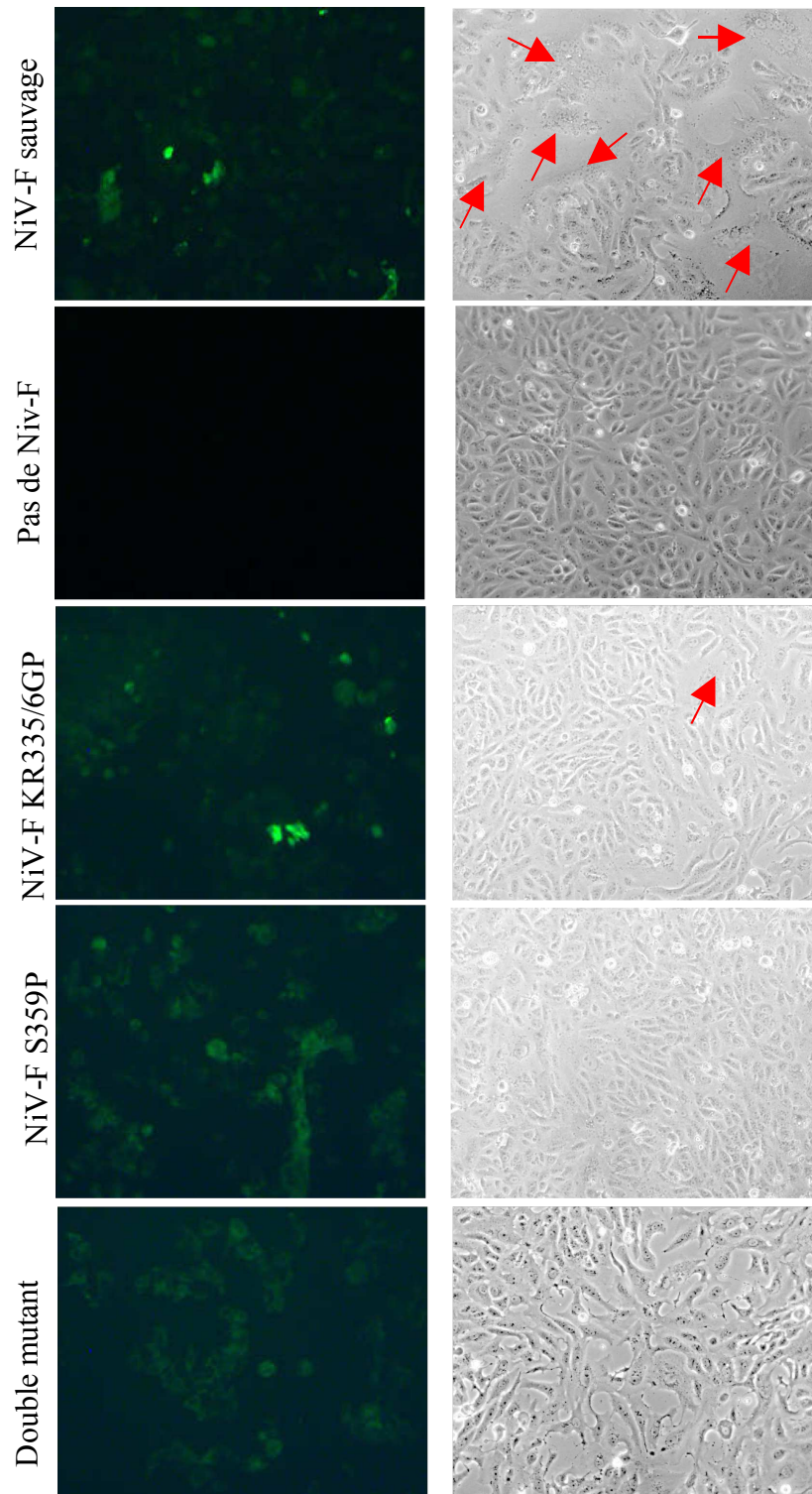


Figure 36 : Les mutations dans les boucles cystéine n'empêche pas l'expression de la glycoprotéine F (vérifié par immuno-marquage, colonne de gauche) mais limitent le nombre de syncytia (flèches rouge, colonne de droite)



et Hendra) ont même été co-immunoprécipitées. Afin de vérifier l'affinité des mutants de la glycoprotéine F pour la glycoprotéine G, j'ai réalisé des expériences de co-immunoprécipitation de ces glycoprotéines.

Mes résultats montrent que la présence de la glycoprotéine G après co-immunoprécipitation avec la glycoprotéine F non mutée est facilement détectable. En revanche, elle disparaît complètement pour le mutant S359P. Ce mutant n'interagit donc pas avec la glycoprotéine G. La présence de la mutation KR335/6GP induit le contraire : la glycoprotéine G est fortement retrouvée après co-immunoprécipitation, en quantité bien plus grande qu'avec la glycoprotéine F sauvage. La trop forte association entre ces deux protéines est probablement responsable du faible nombre de syncytia observés lors de la co-transfection. Comme chez les Morbillivirus, il semble exister une relation inverse entre le degré d'association des glycoprotéines et la capacité de fusion (Plempner2002). La co-immunoprécipitation avec le double mutant se solde (comme pour le test de fusion) par un résultat identique à ce qui avait été obtenu avec la mutation S359P : pas d'interaction.

Ce domaine riche en cystéine de la glycoprotéine qui existe aussi chez les Morbillivirus semble avoir le même rôle chez les Henipavirus : l'interaction avec la glycoprotéines G. En mutant les boucles cystéines, on perturbe cette interaction : trop forte, le virus ne fusionne pas correctement ; trop faible le virus ne fusionne pas du tout.

## **VII-Rôle de la conformation de la tige de l'éphrineB2 dans l'infection par les Henipavirus**

### ***VII-1-Hypothèse de travail***

Les humains, les souris et les Ptéropides représentent 3 types d'infections différentes. Les premiers développent une encéphalite mortelle, les secondes sont non infectables et les troisièmes sont des porteurs sains. Lorsque l'on regarde et compare les séquences d'acides aminés des éphrineB2 de ces trois mammifères, elles sont quasiment identiques. On note cependant des différences majeures dans la tige extra-cellulaire. Chez l'homme, la tige extra-cellulaire est prédite droite, alors que chez la souris elle est prédite tordue au niveau des acides aminés 181-182 (acides aminés 179-180 chez l'humain) par un

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
Homo_sapiens  ..-MA-VRRDSSVWKYCFGVLMLVLCRTAISKSTVLEPIYHNSNSKFLPGQGLVLYPQIGDKLDIICPKVDSKTVGGQYFYKVMVDKDQADRCTIKKENTP
Mus_musculus  MA..RS.....L.....R.....
Pteropus_vampyrus  --A.....R.....S..T...
Pteropus_alecto  --A.....R.....S..T...

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Homo_sapiens  LLNCAKPDQDIKFTIKFQEFSPNLWGLEFQKNKDYIISTSNGLLEGLDNQEGGVCGQTRAMKILMKVGGDASSAGSTRNKDPTRRPELEAGTNGRSSTTS
Mus_musculus  ..R...V.....A..HG.....
Pteropus_vampyrus  ..R...V.....HN...H...QAP...
Pteropus_alecto  ..R...V.....HN...H...QAP...

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Homo_sapiens  PFVKPNPQSSDGNHSAGHSGNHILGSEVALFAGIASGCIIFIVIIITLVVLLKYRRRHKHSQHTTTLSTLATPKRSGNNNGSEPSDIIIPLRITAD
Mus_musculus  .....L.....G.....V.....
Pteropus_vampyrus  ...S.....A.....
Pteropus_alecto  ...S.....A.....

      310     320     330
Homo_sapiens  SVFCPHYEKVSGDYGHFVYIVQEMPPQSPANIYYKV
Mus_musculus
Pteropus_vampyrus
Pteropus_alecto

```

```

                                180     190     200
Homo_sapiens  ...|...|...|...|...|...|
Mus_musculus  SSAGSTRNKDPTRRPELEAGTNGRSSTTS
Pteropus_vampyrus  ...A..HG...
Pteropus_alecto  ...HN...H...QAP...

```

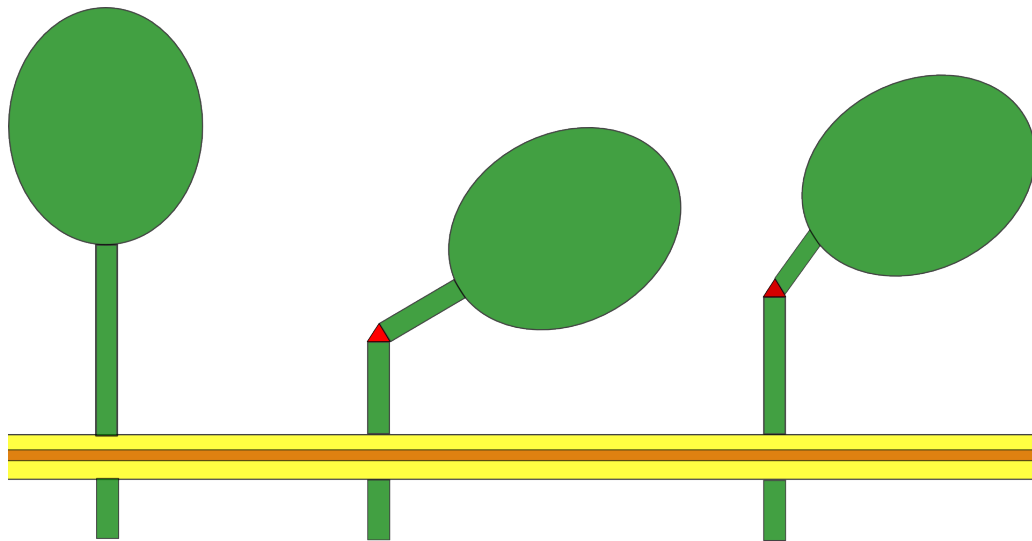


Figure 37 : En haut : Comparaison des séquences d'éphrine B2 humaine, murine et mégachiroptérienne. Les acides aminés non divergents sont représentés par des points. Les acides aminés entre les positions 180 et 190 (agrandissement) provoquent des différences de structure entre les différentes protéines : ainsi, un tour  $\beta$  est présent dans la protéine murine (position 181-182, surlignée en rouge) mais pas dans l'humaine. Chez les chauves-souris, le tour  $\beta$  est bien présent, mais quelques acides aminés plus loin (position 189-190, surligné en jaune). En bas: Représentation schématique des structures prédites des éphrineB2 humaines (à gauche), murines (au centre) et de Pteropides (à droite). Ces deux dernière présentent un tour  $\beta$  (en rouge) qui modifie l'inclinaison de la tête.

tour  $\beta$ . De plus, nous avons remarqué chez les chauves-souris *Pteropus vampyrus* la tige est aussi prédite tordue. Mais le tour  $\beta$  se trouve quelques acides aminés plus loin (position 189-190).

Afin de vérifier si le tour  $\beta$  de l'éphrineB2 murine a un effet protecteur contre les Henipavirus, nous avons introduit par mutagenèse dirigée des mutations dans deux types d'éphrineB2, humaine et murine, de façon à reproduire la conformation de la tige de l'un chez l'autre et réciproquement. Ces échanges correspondent aux mutations D179G pour l'éphrineB2 humaine et G181D pour l'éphrineB2 murine. Les plasmides codant les éphrineB2 mutées ou sauvages ont ensuite été transfectés dans des cellules CHO puis infectés avec le virus Nipah.

### ***VII-2-Effet potentiel de l'angle de la tige sur l'entrée du virus***

Les cellules CHO transfectées avec le vecteur codant l'éphrineB2 humaine ont été bien infectées et produisent des syncytia en grandes quantités. En revanche, les cellules transfectées avec l'éphrineB2 murine restent ininfectables.

De manière intéressante, les cellules transfectées avec le mutant de l'éphrineB2 humaine (avec un tour  $\beta$  comme la version murine) ne présentent pas de syncytia. La modification de la tige confère donc une protection contre le virus Nipah. Réciproquement, la suppression du tour  $\beta$  de la tige de l'éphrineB2 murine lève cette protection.

D'après ces résultats, il semblerait que la protection des souris par rapport aux humains (et d'autres mammifères) réside dans ce tour  $\beta$  situé au milieu de la tige extracellulaire de l'éphrineB2.

## VIII- Dépistage des Hénipavirus chez les chauves-souris du Sud de la France

### *VIII-1-Le cas des chauves-souris européennes*

#### **Introduction**

Les études citées dans les chapitres précédents ont montré une répartition des Henipavirus très large géographiquement. Cette répartition est due au réservoir du virus : les chauves-souris. Les Mégachiroptères sont les principaux réservoirs, mais nous avons vu que les Microchiroptères pouvaient l'être aussi. Au cours de cette thèse, j'ai pu tester des chauves-souris européennes pour les Henipavirus.

Le but de cette étude était de déterminer la présence ou l'absence d'Henipavirus dans les grottes fréquentées des chauves-souris. Ces grottes, situées dans les gorges du Gardon sont un passage nécessaire pour beaucoup d'entre-elles. Certaines viennent y hiberner ou hiverner, d'autre viennent s'y reproduire. Ces chauves-souris étant protégées (et dans certains cas menacées), la sauvegarde et l'étude de leur environnement sont primordiales. Ces grottes sont aussi un atout touristique important pour la région. La protection des chauves-souris et l'exploitation touristique sont malgré tout conciliables.

#### **Prélèvements**

Les prélèvements de guano ont été réalisés dans 4 grottes des gorges du Gardon : le Sambuc, St Joseph, St Veredennes et la Sartanette avec Guy Derivaz (agent assermenté pour la capture des chauves-souris), le 30 Novembre 2007. Les échantillons ont été immédiatement placés dans 0.5mL de PBS et congelés en carboglace à la sortie de la grotte.

#	Echantillons	Chiroptères présents	Zone Géographique
1	Guano	R.e, R.g, M.c, M.s	Sambuc
2	Guano	R.e, R.g, M.c, M.s	Sambuc
3	Guano	R.e, R.g, M.c, M.s	Sambuc
4	Guano	R.e, R.g, M.c, M.s	Sambuc
5	Guano	R.e, R.g, M.c, M.s	St Joseph
6	Guano	R.e, R.g, M.c, M.s	St Joseph
7	Guano	R.e, R.g, M.c, M.s	St Joseph, au fond
8	Guano	M.c,	Sartanette
9	Guano	M.g, M.c, M.s	Sartanette
10	Guano	M.g,	Sartanette
11	Guano	M.g,	Sartanette
12	Sable		Sartanette
A	Eau		St Veredennes

#### Liste des abreviations :

R.e, Rhinolophe Euriale

R.g, Grand Rhinolophe

M.c, Murin de Capaccini

M.g, Grand Murin

M.s Minioptère de Schreiber

*Figure 38 : Ci-contre, en haut : les gorges du Gardon, dans le sud de la France (Gard). Ci contre, en bas : La grotte du Sambuc. C'est dans cette salle qu'ont été réalisé certains prélèvements. (Source : Arnaud Parvillé)*



### ***Extraction des virus et infections :***

Les échantillons sont décongelés en laboratoire et homogénéisés dans 1mL de PBS. Chaque homogénat est ensuite centrifugé 5 minutes à 1000g et le surnageant est filtré sur membrane (pore 0,22µM) afin que seuls les virus puissent traverser.

Les virus purifiés ont ensuite été utilisés pour infecter des cellules Vero: 100µL de virus ont été mélangés avec 400µL de milieu nutritif DMEM. Le mélange est utilisé pour infecter un puits de 10<sup>5</sup> cellules Vero pendant une heure à 37°C en laboratoire P4. Le milieu d'infection est ensuite complété par 1mL de DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau, ainsi qu'avec les antibiotiques pénicilline/streptomycine et l'antimycotique fungizone. Les observations sont réalisées fréquemment pendant une semaine (Reynes2005).

Au bout d'une semaine, les surnageants sont collectés : 100µL servent à infecter d'autres cellules dans les mêmes conditions que décrites précédemment. 100µL sont utilisés pour extraire les ARN viraux selon les procédures du laboratoire P4. Ces ARN sont conservés au CERVI de Lyon pour d'éventuelles études rétrospectives.

### ***VIII-2-Résultats***

Aucun prélèvement n'a induit la formation de syncytia. On peut donc conclure qu'il n'y avait pas d'Hénipavirus infectieux présent dans les prélèvements réalisés.

## **PERSPECTIVES**



## Études des récepteurs viraux par test d'internalisation

L'internalisation et la dégradation d'un récepteur par l'expression d'une glycoprotéine virale est un bon moyen de tester de nouveaux inhibiteurs ou des mutations dans un domaine fonctionnel. Cela est particulièrement vrai pour des virus P4. Le travail en P4 est difficile et onéreux. Ce système d'analyse de régulation négative du récepteur est au contraire simple d'utilisation et peut être réalisé en P1 ou P2. De plus, il a déjà fait ses preuves avec le virus de la rougeole, le virus Hendra et le virus Nipah.

Il serait d'ailleurs très intéressant de tester différentes éphrines selon ce protocole, notamment les éphrines avec ou sans tour  $\beta$  citées dans un précédent chapitre.

Plusieurs pathogènes peuvent entrer par macropinocytose. Parmi les exemples cités, plusieurs utilisent comme récepteur la protéine CD46. Le cas de CD46 est très intéressant : comme éphrineB2, c'est une protéine capable d'émettre un signal cellulaire, et comme éphrineB2 il induit la formation de filopodes (Pernet2009). On pourrait ainsi généraliser l'hypothèse d'une entrée par macropinocytose à tous les pathogènes intracellulaires ayant un récepteur capable de transmettre un signal intra-cellulaire, d'induire la formation de filopodes et étant régulé négativement après infection. C'est le cas notamment des récepteurs tyrosines kinases et des récepteurs aux facteurs de croissance.

Qu'en est-il des autres virus cités en exemple d'entrée par macropinocytose? Dans le cas du VIH, les co-récepteurs viraux sont des récepteurs des chémokines, c'est-à-dire des protéines capables d'émettre un signal intracellulaire. Dans le cas du virus de la dengue de type 2, la présence de filopodes est nécessaire pour l'entrée du virus dans les cellules HMEC-1 et le récepteur est une molécule de la motilité cellulaire dont la signalisation régule Rac1/Cdc42 : l'intégrine  $\alpha5\beta3$  (Zamudio-Meza2009).

Inversement, le cas d'un virus dont on aurait noté l'entrée par macropinocytose sans pour autant connaître son récepteur : il serait envisageable de rechercher le récepteur parmi les protéines répondant aux critères énoncés précédemment, limitant ainsi le nombre de candidats. Un cas concret est le virus Ebola.

## Cancer, éphrineB2 et le virus Nipah

De par son rôle dans l'angiogénèse et la neurogénèse, l'éphrineB2 est une protéine extrêmement régulée, qui intervient principalement dans le développement précoce. Or, elle est souvent retrouvée dans les lignées tumorales. Plus généralement, on la retrouve exprimée dans bon nombre de cellules de tumeurs solides. La structure d'une tumeur solide l'empêche de grandir sans créer son propre système vasculaire. Une réactivation de l'éphrineB2 permet de recruter les cellules nécessaires à l'élaboration d'un système d'irrigation de la tumeur. Ainsi, ces trois dernières années, l'éphrineB2 a été détectée dans de nombreux cancers et est devenue un marqueur de la plupart des tumeurs solides testées.

Nous avons vu que le virus Nipah était capable de réguler négativement l'éphrineB2 grâce à sa glycoprotéine G. Théoriquement, il serait donc possible d'utiliser la glycoprotéine G pour limiter la croissance tumorale : en régulant négativement l'éphrineB2, la glycoprotéine G pourrait empêcher la formation d'un nouveau système vasculaire au niveau de la tumeur, bloquant le développement de cette dernière.

Plus intéressant, mais plus difficile est l'utilisation du virus Nipah comme virus oncolytique. Nous avons vu que le virus Nipah était capable de détruire un tapis cellulaire en moins de 72 heures, et de générer des foyers nécrotiques de plusieurs millimètres de diamètre dans les tissus exprimant fortement l'éphrineB2 ou B3, tel le cerveau. Comme le cerveau, de nombreuses tumeurs expriment fortement éphrineB2. L'utilisation d'un virus atténué pourrait être envisagée pour l'affaiblissement, voire la destruction de tumeurs exprimant éphrineB2.

Malheureusement, un virus Nipah ou Hendra atténué n'est pas encore d'actualité. L'utilisation d'un tel virus comme agent oncolytique est théoriquement très séduisante (selon ma propre opinion) mais reste encore scientifiquement lointain.



## **DISCUSSION ET CONCLUSION**

Les virus Hendra et Nipah sont des Paramyxovirus presque comme les autres. Leur classement dans un nouveau genre est tout à fait sensé. Ils seront peut-être bientôt rejoints par les deux virus en cours de séquençage au Ghana. Mais il faut cependant bien comprendre qu'il existe des différences fondamentales entre les Henipavirus et, par exemple, les Morbillivirus qui sont leurs plus proches parents connus à ce jour.

Leur capacité à passer d'une espèce à une autre, et même d'un ordre à un autre en est un exemple. Bien que nous ayons vu que certains Morbillivirus (par exemple CDV) en étaient capable, cela reste une exception, alors que c'est la règle dans le cas des Henipavirus. Leur génome exceptionnellement long, leur taux de mortalité très élevé ou encore la mutation dans leur polymérase d'un site catalytique conservé parmi tous les Mononégavirales sont d'autres exemples.

Il n'est donc pas possible de supposer que tout ce que l'on sait de ces virus s'applique aux Henipavirus. L'étude de l'entrée en est la preuve. La totalité des revues consacrées aux Henipavirus décrit l'entrée des Henipavirus comme celle des Morbillivirus : par fusion à la membrane plasmique. La fusion indépendante du pH en est l'argument principal. Nous avons cependant pu voir que le virus pouvait entrer par macropinocytose. En mutant la tyrosine 304 de l'éphrineB2, on peut même bloquer l'entrée de la quasi totalité du virus. Les inhibiteurs des éléments régulant la forme et les mouvements de la membrane cellulaire sont par la même occasion de très bons inhibiteurs de l'entrée. Ainsi, la génistéine, la wortmannin, la Toxine B de *C.difficile* ainsi que l'amiloride et la chloroquine ont montré leur efficacité *in vitro*.

Plus intéressant encore, ces deux dernières drogues ont montré une efficacité *in vivo*, et bien que ces expériences demandent confirmation, elle ouvrent la voie à un traitement contre les Henipavirus. Ce traitement, contrairement à ceux tentés jusqu'à présent (à base de ribavirine) est peu onéreux, facile d'emploi : les poudres se conservent à température ambiante et s'administrent *per os*).

Il a été cependant très difficile de faire publier ces résultats. La raison de cela est la publication d'articles contradictoires. En 2007, Sawatsky et son équipe (Sawatsky2007) concluaient un article en écrivant qu'il n'y a pas de régulation négative de l'éphrineB2 par la glycoprotéine G, et ce alors que toutes leurs expériences supposaient le contraire. Il s'avère que la dernière d'entre-elles, un immuno-marquage, avait été faite avec un anticorps non

spécifique de la partie extra-cellulaire de l'éphrineB2. D'après les données du fabricant, cet anticorps est dirigé contre la partie cytoplasmique de l'éphrineB2. La prise en compte des résultats obtenus avec cet anticorps a faussé tous les autres.

Plus tard l'équipe, l'équipe allemande d'Andrea Maisner affirmait que l'endocytose n'avait aucun effet sur l'entrée du virus Nipah. De nombreuses expériences avaient permis d'exclure un à un les différents mécanismes d'endocytose. Seul un mécanisme n'avait pas été testé : la macropinocytose. Plus tard, la même équipe montrait que le virus Nipah pouvait entrer même si le récepteur cellulaire éphrineB2 était privé de sa queue cytoplasmique. Cependant, nous avons remarqué que sur le *western blot* publié dans leur article, la taille de cette éphrineB2 déléetée de sa queue cytoplasmique était de 37kDa, la même que celle non déléetée (Thiel2008).

Depuis quelques temps, d'autres équipes s'intéressent à la chloroquine. L'équipe d'Anne Moscona a montré que des concentrations de l'ordre du micromolaire pouvait empêcher l'entrée du virus, alors que les résultats présentés dans cette thèse sont 10 à 30 fois plus élevés. En regardant de plus près le protocole employé, on peut voir que les glycoprotéines G utilisées pour cette étude sont déléetées de leur queue cytoplasmique(Porotto2009.). Or nous avons vu que ce genre de déléetion affectait la capacité des virus à développer des syncytia, ainsi que leur sensibilité aux antiviraux.

Ces expériences exagérant l'efficacité de la chloroquine commencent à avoir des répercussions : un article publié récemment par l'équipe de Lin-Fa Wang et Chris C Broder a montré que la chloroquine n'avait aucun effet protecteur sur des furets infectés par des doses massives de virus Nipah. Cependant, leur étude présente deux problèmes. Premièrement, le furet est un animal qui reproduit uniquement (mais parfaitement) le syndrome pulmonaire associé aux Henipavirus (B Mungall, Communication Publique à l'Université de Floride, 2008), contrairement à notre modèle : le hamster doré. Deuxièmement, les doses utilisées sont extrêmement faibles : 25mg/kg/j. Au cours de cette thèse, j'ai du utiliser 500mg/kg/jour pour commencer à obtenir un résultat.

Cependant, il est vrai que 500 mg/kg/jour n'est pas une posologie recommandable pour l'être humain, c'est même une dose mortelle sans assistance médicale. En fait, la dose mortelle pour l'homme est très proche de la dose nécessaire pour commencer à limiter l'action du virus. Par contre, l'utilisation d'hydroxychloroquine permet d'utiliser des doses plus élevées avec moins de risques. Nous avons ainsi vu l'exemple d'une prise de 22g d'hydroxychloroquine *pers os* non mortelle (Yanturali2004). Mais quelle que soit la

molécule utilisée, les doses sont telles qu'une hospitalisation et un suivi médical intensif sont nécessaires à la survie du patient. Le traitement doit donc encore être amélioré, et les combinaisons avec le Diazepam semblent être une voie intéressante. Il reste cependant beaucoup de travail avant de déterminer un protocole sur pour traiter l'être humain.

Si nous revenons sur les mécanismes d'interaction entre la glycoprotéine G et l'éphrineB2, nous pouvons classer ces mécanismes en deux type différents :

- l'entrée par macropinocytose, qui est réalisée par une glycoprotéine G complète (c'est-à-dire commençant à la méthionine 1) inter-agissant avec une éphrineB2 complète (c'est-à-dire avec une queue cytoplasmique intacte).
- La fusion cellule-cellule, ou dispersion par formation de syncytia, qui ne nécessite que la parties extra-cellulaires d'éphrineB2

De manière intéressante, nous avons remarqué que la glycoprotéine H possède elle aussi une deuxième méthionine en phase, et qu'elle aussi va influencer la taille de la queue cytoplasmique. Or, nous avons vu dans un chapitre précédent que la glycoprotéine H de la souche vaccinale de la rougeole pouvait réguler négativement son récepteur CD46 et que, de plus, elle pouvait induire l'internalisation de CD46 par ce qui semble être de la macropinocytose.

Cette notion d'internalisation dépendant de la taille de la queue cytoplasmique pourrait expliquer pourquoi certains virus entrent soit par macropinocytose soit par fusion à la membrane. Nous avons aussi vu que ce genre de détail pouvait influencer la sensibilité aux médicaments.

Il reste cependant un mystère à éclaircir : La glycoprotéine F ne semble pas activée automatiquement et immédiatement comme décrit dans la littérature, et si l'on se réfère à certaines expériences inhibant les liaisons entre domaine HR (et malheureusement peu ou pas analysées), le rôle de F est même douteux pour l'entrée (Bossart2005).

## REFERENCES



## References

- Aguilar HC, Ataman ZA, Aspericueta V, Fang AQ, Stroud M et al. (2009) A novel receptor-induced activation site in the Nipah virus attachment glycoprotein (G) involved in triggering the fusion glycoprotein (F). *J Biol Chem* 284: 1628-1635.
- Aguilar HC, Matreyek KA, Filone CM, Hashimi ST, Levroney EL et al. (2006) N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry. *J Virol* 80: 4878-4889.
- Alam SM, Fujimoto J, Jahan I, Sato E, Tamaya T (2007) Overexpression of ephrinB2 and EphB4 in tumor advancement of uterine endometrial cancers. *Ann Oncol* 18: 485-490.
- Alam SM, Fujimoto J, Jahan I, Sato E, Tamaya T (2008) Coexpression of EphB4 and ephrinB2 in tumour advancement of ovarian cancers. *Br J Cancer* 98: 845-851.
- Alam SM, Fujimoto J, Jahan I, Sato E, Tamaya T (2009) Coexpression of EphB4 and ephrinB2 in tumor advancement of uterine cervical cancers. *Gynecol Oncol* 114: 84-88.
- Amstutz B, Gastaldelli M, Kälin S, Imelli N, Boucke K et al. (2008) Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J* 27: 956-969.
- Anlar B, Ayhan A, Hotta H, Itoh M, Engin D et al. (2002) Measles virus RNA in tonsils of asymptomatic children. *J Paediatr Child Health* 38: 424-425.
- Appel MJ, Summers BA (1995) Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet Microbiol* 44: 187-191.
- Aslan H (2007) Etude fonctionnelle de la glycoprotéine G des virus Nipah et Hendra. . .
- Backovic M, Jardetzky TS (2009) Class III viral membrane fusion proteins. *Curr Opin Struct Biol* 19: 189-196.
- Baker KA, Dutch RE, Lamb RA, Jardetzky TS (1999) Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell* 3: 309-319.
- Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, Xu L, Zaki SR et al. (2009) Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. *Science* 325: 204-206.
- Bausch DG, Borchert M, Grein T, Roth C, Swanepoel R et al. (2003) Risk factors for Marburg hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis* 9: 1531-1537.
- Bender C, Hall H, Huang J, Klimov A, Cox N et al. (1999) Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. *Virology* 254: 115-123.
- Bermejo M, Rodríguez-Teijeiro JD, Illera G, Barroso A, Vilà C et al. (2006) Ebola outbreak killed 5000 gorillas. *Science* 314: 1564.
- Bitnun A, Shannon P, Durward A, Rota PA, Bellini WJ et al. (1999) Measles inclusion-body encephalitis caused by the vaccine strain of measles virus. *Clin Infect Dis* 29: 855-861.
- Bonaparte MI, Dimitrov AS, Bossart KN, Crameri G, Mungall BA et al. (2005) Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10652-10657.
- Bossart KN, Crameri G, Dimitrov AS, Mungall BA, Feng Y et al. (2005) Receptor binding, fusion inhibition, and induction of cross-reactive neutralizing antibodies by a soluble G glycoprotein of Hendra virus. *J Virol* 79: 6690-6702.
- Bossart KN, McEachern JA, Hickey AC, Choudhry V, Dimitrov DS et al. (2007) Neutralization assays for differential henipavirus serology using Bio-Plex protein array systems. *J Virol Methods* 142: 29-40.
- Bowden TA, Crispin M, Harvey DJ, Aricescu AR, Grimes JM et al. (2008) Crystal structure and carbohydrate analysis of Nipah virus attachment glycoprotein: a template for antiviral and vaccine design. *J Virol* 82: 11628-11636.
- Bowden, T.A., Aricescu, A.R., Gilbert, R.J.C, Grimes, J.M, Jones, E.Y and Stuart, D.I (2008)

Structural basis of Nipah and Hendra virus attachment to their cell-surface receptor ephrin-B2. *Nat Struct Mol Biol* 15: 567-572.

Calain P, Roux L (1993) The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 67: 4822-4830.

Campbell H, Andrews N, Brown KE, Miller E (2007) Review of the effect of measles vaccination on the epidemiology of SSPE. *Int J Epidemiol* 36: 1334-1348.

Cantín C, Holguera J, Ferreira L, Villar E, Muñoz-Barroso I (2007) Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. *J Gen Virol* 88: 559-569.

Cattaneo R (2004) Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol* 78: 4385-4388.

CDC (1999) Outbreak of Hendra-like virus--Malaysia and Singapore, 1998-1999. *Morb Mortal Wkly Rep* 48(13): 265-269.

Chen J, Fang F, Yang Z, Liu X, Zhang H et al. (2009) Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated from poultry markets in central China. *Virus Res In Press*: .

Cheng VCC, Lau SKP, Woo PCY, Yuen KY (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev* 20: 660-694.

Chrencik JE, Brooun A, Kraus ML, Recht MI, Kolatkar AR et al. (2006) Structural and biophysical characterization of the EphB4\*ephrinB2 protein-protein interaction and receptor specificity. *J Biol Chem* 281: 28185-28192.

Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PS et al. (1999) Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 354: 1257-1259.

Chua KB, Lam SK, Tan CT, Hooi PS, Goh KJ et al. (2000) High mortality in Nipah encephalitis is associated with presence of virus in cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 48: 802-805.

Chua KB, Wang LF, Lam SK, Cramer G, Yu M et al. (2001) Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia. *Virology* 283: 215-229.

Ciancanelli MJ, Basler CF (2006) Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *J Virol* 80: 12070-12078.

Ciancanelli MJ, Volchkova VA, Shaw ML, Volchkov VE, Basler CF (2009) Nipah virus sequesters inactive STAT1 in the nucleus via a P gene-encoded mechanism. *J Virol* 83: 7828-7841.

Clemens DL, Lee B, Horwitz MA (2005) *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* 73: 5892-5902.

Clemessy JL, Taboulet P, Hoffman JR, Hantson P, Barriot P et al. (1996) Treatment of acute chloroquine poisoning: a 5-year experience. *Crit Care Med* 24: 1189-1195.

Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE et al. (1995) A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376: 260-263.

Cowan CA, Henkemeyer M (2001) The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* 413: 174-179.

Cramer G, Wang L, Morrissy C, White J, Eaton BT (2002) A rapid immune plaque assay for the detection of Hendra and Nipah viruses and anti-virus antibodies. *J Virol Methods* 99: 41-51.

Crimeen-Irwin B, Ellis S, Christiansen D, Ludford-Menting MJ, Milland J et al. (2003) Ligand binding determines whether CD46 is internalized by clathrin-coated pits or macropinocytosis. *J Biol Chem* 278: 46927-46937.

Csorba G, Ujhelyi P, Thomas N (2003) Horseshoe bats of the world. *Bishop's Castle*. p.

Day BW, Smith FM, Chen K, McCarron JK, Herath NI et al. (2006) Eph/Ephrin membrane proteins: a mammalian expression vector pTIg-BOS-Fc allowing rapid protein purification.

Protein Pept Lett 13: 193-196.

Diederich S, Moll M, Klenk H, Maisner A (2005) The nipah virus fusion protein is cleaved within the endosomal compartment. *J Biol Chem* 280: 29899-29903.

Dravis C, Wu T, Chumley MJ, Yokoyama N, Wei S et al. (2007) EphB2 and ephrin-B2 regulate the ionic homeostasis of vestibular endolymph. *Hear Res* 223: 93-104.

Drexler JF, Corman VM, Gloza-Rausch F, Seebens A, Annan A et al. (2009) Henipavirus RNA in African bats. *PLoS One* 4: e6367.

Eaton BT, Broder CC, Middleton D, Wang L (2006) Hendra and Nipah viruses: different and dangerous. *Nat Rev Microbiol* 4: 23-35.

Edwards CM, Mundy GR (2008) Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis. *Int J Med Sci* 5: 263-272.

Eshaghi M, Tan WS, Ong ST, Yusoff K (2005) Purification and characterization of Nipah virus nucleocapsid protein produced in insect cells. *J Clin Microbiol* 43: 3172-3177.

Faix J, Rottner K (2006) The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol* 18: 18-25.

Fidock DA, Eastman RT, Ward SA, Meshnick SR (2008) Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. *Trends Parasitol* 24: 537-544.

FREEDMAN, A. and STEINBERG, V.L (1960) Chloroquine in rheumatoid arthritis; a double blindfold trial of treatment for one year. *Ann Rheum Dis* 19: 243-250.

Füller T, Korff T, Kilian A, Dandekar G, Augustin HG (2003) Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells. *J Cell Sci* 116: 2461-2470.

Galbraith SE, Tiwari A, Baron MD, Lund BT, Barrett T et al. (1998) Morbillivirus downregulation of CD46. *J Virol* 72: 10292-10297.

Gardner M (1994) Mystery horse virus - Australia (Original report 1994). . .

Garg RK (2002) Subacute sclerosing panencephalitis. *Postgrad Med J* 78: 63-70.

Garg RK (2008) Subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurol* 255: 1861-1871.

Georges-Courbot MC, Contamin H, Faure C, Loth P, Baize S et al. (2006) Poly(I)-poly(C12U) but not ribavirin prevents death in a hamster model of Nipah virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1768-1772.

Gill DB, Atkinson JP (2004) CD46 in Neisseria pathogenesis. *Trends Mol Med* 10: 459-465.

Goetsch W, Augustin HG, Morawietz H (2004) Down-regulation of endothelial ephrinB2 expression by laminar shear stress. *Endothelium* 11: 259-265.

Goh KJ, Tan CT, Chew NK, Tan PS, Kamarulzaman A et al. (2000) Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. *N Engl J Med* 342: 1229-1235.

GOLDMAN, L., COLE, D.P and PRESTON, R.H (1953) Chloroquine diphosphate in treatment of discoid lupus erythematosus. *J Am Med Assoc* 152: 1428-1429.

Grant BD, Donaldson JG (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 597-608.

Gray RR, Tatem AJ, Lamers S, Hou W, Laeyendecker O et al. (2009) Spatial phylodynamics of HIV-1 epidemic emergence in east Africa. *AIDS* 23: F9-F17.

Griffin D (2001) *Virology*, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins. p.

Guillaume V, Aslan H, Ainouze M, Guerbois M, Wild TF et al. (2006) Evidence of a potential receptor-binding site on the Nipah virus G protein (NiV-G): identification of globular head residues with a role in fusion promotion and their localization on an NiV-G structural model. *J Virol* 80: 7546-7554.

Guillaume V, Contamin H, Loth P, Grosjean I, Courbot MCG et al. (2006) Antibody prophylaxis and therapy against Nipah virus infection in hamsters. *J Virol* 80: 1972-1978.

Guillaume V, Lefeuvre A, Faure C, Marianneau P, Buckland R et al. (2004) Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR (TaqMan). *J Virol Methods* 120: 229-237.

Guillaume, V., Contamin, H, Loth, P, Georges-Courbot, M, Lefeuvre, A, Marianneau, P,

Chua, K.B, Lam, S.K, Buckland, R, Deubel, V and Wild, T.F (2004) Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. *J Virol* 78: 834-840.

Haigler HT, McKanna JA, Cohen S (1979) Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J Cell Biol* 83: 82-90.

Halpin K, Bankamp B, Harcourt BH, Bellini WJ, Rota PA (2004) Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay. *J Gen Virol* 85: 701-707.

Halpin K, Young PL, Field H, Mackenzie JS (1999) Newly discovered viruses of flying foxes. *Vet Microbiol* 68: 83-87.

Harcourt BH, Tamin A, Ksiazek TG, Rollin PE, Anderson LJ et al. (2000) Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology* 271: 334-349.

Harder T, Willhaus T, Frey HR, Liess B (1990) Morbillivirus infections of seals during the 1988 epidemic in the Bay of Heligoland: III. Transmission studies of cell culture-propagated phocine distemper virus in harbour seals (*Phoca vitulina*) and a grey seal (*Halichoerus grypus*): clinical, virological and serological results. *Zentralbl Veterinarmed B* 37: 641-650.

Hayman DTS, Suu-Ire R, Breed AC, McEachern JA, Wang L et al. (2008) Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *PLoS One* 3: e2739.

Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ et al. (2006) Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313: 217-220.

Holmberg J, Frisén J (2002) Ephrins are not only unattractive. *Trends Neurosci* 25: 239-243.

Hsu VP, Hossain MJ, Parashar UD, Ali MM, Ksiazek TG et al. (2004) Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 10: 2082-2087.

Hughes I, Jenney ME, Newton RW, Morris DJ, Klapper PE (1993) Measles encephalitis during immunosuppressive treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *Arch Dis Child* 68: 775-778.

Hyatt AD, Zaki SR, Goldsmith CS, Wise TG, Hengstberger SG (2001) Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect* 3: 297-306.

Iehlé C, Razafitrimo G, Razainirina J, Andriaholinirina N, Goodman SM et al. (2007) Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropodid bats, Madagascar. *Emerg Infect Dis* 13: 159-161.

Iwata K, Seya T, Yanagi Y, Pesando JM, Johnson PM et al. (1995) Diversity of sites for measles virus binding and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein CD46. *J Biol Chem* 270: 15148-15152.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D et al. (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993.

Jones-Engel L, Engel GA, Schillaci MA, Lee B, Heidrich J et al. (2006) Considering human-primate transmission of measles virus through the prism of risk analysis. *Am J Primatol* 68: 868-879.

Kawashima H, Mori T, Takekuma K, Hoshika A, Hata M et al. (1996) Polymerase chain reaction detection of the hemagglutinin gene from an attenuated measles vaccine strain in the peripheral mononuclear cells of children with autoimmune hepatitis. *Arch Virol* 141: 877-884.

Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA et al. (1998) Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 4: 1302-1307.

Kilby JM, Lalezari JP, Eron JJ, Carlson M, Cohen C et al. (2002) The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 685-693.

Kobayashi H, Kitamura T, Sekiguchi M, Homma MK, Kabuyama Y et al. (2007)

Involvement of EphB1 receptor/EphrinB2 ligand in neuropathic pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 32: 1592-1598.

Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J et al. (1998) Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol* 72: 891-899.

Kolakofsky D, Roux L, Garcin D, Ruigrok RWH (2005) Paramyxovirus mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis. *J Gen Virol* 86: 1869-1877.

Korff T, Braun J, Pfaff D, Augustin HG, Hecker M (2008) Role of ephrinB2 expression in endothelial cells during arteriogenesis: impact on smooth muscle cell migration and monocyte recruitment. *Blood* 112: 73-81.

Kumar SR, Singh J, Xia G, Krasnoperov V, Hassanieh L et al. (2006) Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *Am J Pathol* 169: 279-293.

Lamb RA, Jardetzky TS (2007) Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol* 17: 427-436.

Lanzetti L, Di Fiore PP, Scita G (2001) Pathways linking endocytosis and actin cytoskeleton in mammalian cells. *Exp Cell Res* 271: 45-56.

Lecouturier V, Fayolle J, Caballero M, Carabaña J, Celma ML et al. (1996) Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *J Virol* 70: 4200-4204.

Lee SW, Bonnah RA, Higashi DL, Atkinson JP, Milgram SL et al. (2002) CD46 is phosphorylated at tyrosine 354 upon infection of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *J Cell Biol* 156: 951-957.

Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A et al. (2005) Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438: 575-576.

Li Y, Wang J, Hickey AC, Zhang Y, Li Y et al. (2008) Antibodies to Nipah or Nipah-like viruses in bats, China. *Emerg Infect Dis* 14: 1974-1976.

Lim CC, Sitoh YY, Hui F, Lee KE, Ang BS et al. (2000) Nipah viral encephalitis or Japanese encephalitis? MR findings in a new zoonotic disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 21: 455-461.

Liszewski MK, Atkinson JP (1991) The role of complement in autoimmunity. *Immunol Ser* 54: 13-37.

Liu NQ, Lossinsky AS, Popik W, Li X, Gujuluva C et al. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 76: 6689-6700.

Liu W, Jung YD, Ahmad SA, McCarty MF, Stoeltzing O et al. (2004) Effects of overexpression of ephrin-B2 on tumour growth in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 90: 1620-1626.

Luby SP, Hossain MJ, Gurley ES, Ahmed BN, Banu S et al. (2009) Recurrent zoonotic transmission of Nipah virus into humans, Bangladesh, 2001-2007. *Emerg Infect Dis* 15: 1229-1235.

Luby SP, Rahman M, Hossain MJ, Blum LS, Husain MM et al. (2006) Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 12: 1888-1894.

Ma J, JONES G, ZHANG S, SHEN J, METZNER W et al. (2003) Dietary analysis confirms that Rickett's big footed bat is a piscivore. *Journal of Zoology* 261: 245-248.

Mackenzie JS (2005) Emerging zoonotic encephalitis viruses: lessons from Southeast Asia and Oceania. *J Neuroviro* 11: 434-440.

Mahanty S, Bray M (2004) Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet Infect Dis* 4: 487-498.

Maréchal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM et al. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* 75: 11166-11177.

Marie JC, Astier AL, Rivautier P, Roubourdin-Combe C, Wild TF et al. (2002) Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat Immunol* 3: 659-666.

Marston DJ, Dickinson S, Nobes CD (2003) Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol* 5: 879-888.

Masood R, Xia G, Smith DL, Scalia P, Still JG et al. (2005) Ephrin B2 expression in Kaposi sarcoma is induced by human herpesvirus type 8: phenotype switch from venous to arterial endothelium. *Blood* 105: 1310-1318.

Massé N, Ainouze M, Néel B, Wild TF, Buckland R et al. (2004) Measles virus (MV) hemagglutinin: evidence that attachment sites for MV receptors SLAM and CD46 overlap on the globular head. *J Virol* 78: 9051-9063.

Meeran K, Jacobs MG (1993) Chloroquine poisoning. Rapidly fatal without treatment. *BMJ* 307: 49-50.

Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP et al. (2002) Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol* 158: 1119-1131.

Mercer J, Helenius A (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320: 531-535.

Mercer J, Helenius A (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 11: 510-520.

Meyer S, Hafner C, Guba M, Flegel S, Geissler EK et al. (2005) Ephrin-B2 overexpression enhances integrin-mediated ECM-attachment and migration of B16 melanoma cells. *Int J Oncol* 27: 1197-1206.

Mohammadi S, Isberg RR (2009) Yersinia pseudotuberculosis Virulence Determinants Invasin, YopE, and YopT Modulate RhoG Activity and Localization. *Infect Immun* : .

Montagnier L, Chermann JC, Barré-Sinoussi F, Klatzmann D, Wain-Hobson S et al. (1984) Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp* 15: 319-331.

Munshi A (2009) Chloroquine in glioblastoma--new horizons for an old drug. *Cancer* 115: 2380-2383.

Murray K, Rogers R, Selvey L, Selleck P, Hyatt A et al. (1995) A novel morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans. *Emerg Infect Dis* 1: 31-33.

Murray K, Selleck P, Hooper P, Hyatt A, Gould A et al. (1995) A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* 268: 94-97.

Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B et al. (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67: 6025-6032.

Naniche, D., Wild, T.F, Roubourdin-Combe, C and Gerlier, D (1993) Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J Gen Virol* 74 ( Pt 6): 1073-1079.

Negrete OA, Levroney EL, Aguilar HC, Bertolotti-Ciarlet A, Nazarian R et al. (2005) EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* 436: 401-405.

Norbury CC (2006) Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117: 443-451.

Obi S, Yamamoto K, Shimizu N, Kumagaya S, Masumura T et al. (2009) Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. *J Appl Physiol* 106: 203-211.

Olson JG, Rupprecht C, Rollin PE, An US, Niezgodka M et al. (2002) Antibodies to Nipah-like virus in bats (*Pteropus lylei*), Cambodia. *Emerg Infect Dis* 8: 987-988.

Pager CT, Craft WWJ, Patch J, Dutch RE (2006) A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L. *Virology* 346: 251-257.

Parat M (2009) The biology of caveolae: achievements and perspectives. *Int Rev Cell Mol Biol* 273: 117-162.

Patch JR, Cramer G, Wang L, Eaton BT, Broder CC (2007) Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein. *Virology* 4: 1.

Patch JR, Han Z, McCarthy SE, Yan L, Wang L et al. (2008) The YPLGVG sequence of the Nipah virus matrix protein is required for budding. *Virology* 5: 137.

Patel JC, Galán JE (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions. *J Cell Biol* 175: 453-463.

Pennisi A, Ling W, Li X, Khan S, Shaughnessy JDJ et al. (2009) The ephrinB2/EphB4 axis is dysregulated in osteoprogenitors from myeloma patients and its activation affects myeloma bone disease and tumor growth. *Blood* 114: 1803-1812.

Pernet O, Pohl C, Ainouze M, Kweder H, Buckland R (2009) Nipah Virus entry can occur by Macropinocytosis. *Virology* : .

Pfaff D, Héroult M, Riedel M, Reiss Y, Kirmse R et al. (2008) Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes. *J Cell Sci* 121: 3842-3850.

Philbey AW, Kirkland PD, Ross AD, Field HE, Srivastava M et al. (2008) Infection with Menangle virus in flying foxes (*Pteropus* spp.) in Australia. *Aust Vet J* 86: 449-454.

Plempner RK, Hammond AL, Gerlier D, Fielding AK, Cattaneo R (2002) Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *J Virol* 76: 5051-5061.

Pohl C, Duprex WP, Krohne G, Rima BK, Schneider-Schaulies S (2007) Measles virus M and F proteins associate with detergent-resistant membrane fractions and promote formation of virus-like particles. *J Gen Virol* 88: 1243-1250.

Poranen MM, Daugelavicius R, Bamford DH (2002) Common principles in viral entry. *Annu Rev Microbiol* 56: 521-538.

Porotto M, Orefice G, Yokoyama C, Mungall B, Realubit R et al. (2009) Simulating henipavirus multicycle replication in a screening assay leads to identification of a promising candidate for therapy. *J Virol* : .

Porotto, M., Orefice, G, Yokoyama, C.C, Mungall, B.A, Realubit, R, Sganga, M.L, Aljofan, M, Whitt, M, Glickman, F and Moscona, A (2009) Simulating henipavirus multicycle replication in a screening assay leads to identification of a promising candidate for therapy. *J Virol* 83: 5148-5155.

Portnoy JZ, Callen JP (1983) Ophthalmologic aspects of chloroquine and hydroxychloroquine therapy. *Int J Dermatol* 22: 273-278.

Prabakaran P, Zhu Z, Xiao X, Biragyn A, Dimitrov AS et al. (2009) Potent human monoclonal antibodies against SARS CoV, Nipah and Hendra viruses. *Expert Opin Biol Ther* 9: 355-368.

Radhakrishna H, Al-Awar O, Khachikian Z, Donaldson JG (1999) ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci* 112 ( Pt 6): 855-866.

Ragnarsson EGE, Schoultz I, Gullberg E, Carlsson AH, Tafazoli F et al. (2008) Yersinia pseudotuberculosis induces transcytosis of nanoparticles across human intestinal villus epithelium via invasin-dependent macropinocytosis. *Lab Invest* 88: 1215-1226.

Reynes J, Counor D, Ong S, Faure C, Seng V et al. (2005) Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg Infect Dis* 11: 1042-1047.

Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399.

Riou B, Barriot P, Rimailho A, Baud FJ (1988) Treatment of severe chloroquine poisoning. *N Engl J Med* 318: 1-6.

Roche S, Bressanelli S, Rey FA, Gaudin Y (2006) Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 313: 187-191.

Rolain J, Colson P, Raoult D (2007) Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century. *Int J Antimicrob Agents* 30: 297-308.

Roos RP, Graves MC, Wollmann RL, Chilcote RR, Nixon J (1981) Immunologic and virologic studies of measles inclusion body encephalitis in an immunosuppressed host: the relationship to subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 31: 1263-1270.

San Román K, Villar E, Muñoz-Barroso I (1999) Acidic pH enhancement of the fusion of Newcastle disease virus with cultured cells. *Virology* 260: 329-341.

Sarji SA, Abdullah BJ, Goh KJ, Tan CT, Wong KT (2000) MR imaging features of Nipah encephalitis. *AJR Am J Roentgenol* 175: 437-442.

Sawatsky B, Grolla A, Kuzenko N, Weingartl H, Czub M (2007) Inhibition of henipavirus infection by Nipah virus attachment glycoprotein occurs without cell-surface downregulation of ephrin-B2 or ephrin-B3. *J Gen Virol* 88: 582-591.

Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y (2003) Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J Virol* 77: 9943-9950.

Selvey LA, Wells RM, McCormack JG, Ansford AJ, Murray K et al. (1995) Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus. *Med J Aust* 162: 642-645.

Sendow I, Field HE, Adjid A, Ratnawati A, Breed AC et al. (2009) Screening for Nipah Virus Infection in West Kalimantan Province, Indonesia. *Zoonoses Public Health* In Press: .

Sendow I, Field HE, Curran J, Darminto, Morrissy C et al. (2006) Henipavirus in Pteropus vampyrus bats, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 12: 711-712.

SFPEPM (2008) Connaissance et conservation des gîtes et habitats de chasse de 3 chiroptères cavernicole. SFPEPM. p.

Shaw ML, Cardenas WB, Zamarin D, Palese P, Basler CF (2005) Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. *J Virol* 79: 6078-6088.

Shaw ML, Garcia-Sastre A, Palese P, Basler CF (2004) Nipah virus V and W proteins have a common STAT1-binding domain yet inhibit STAT1 activation from the cytoplasmic and nuclear compartments, respectively. *J Virol* 78: 5633-5641.

Sinniah M (1989) A review of Japanese-B virus encephalitis in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 20: 581-585.

Sips GJ, Chesik D, Glazenburg L, Wilschut J, De Keyser J et al. (2007) Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. *Rev Med Virol* 17: 223-244.

Slemons RD, Johnson DC, Osborn JS, Hayes F (1974) Type-A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian Dis* 18: 119-124.

Snell NJC (2004) Ribavirin therapy for Nipah virus infection. *J Virol* 78: 10211.

Somesh BP, Vlahou G, Iijima M, Insall RH, Devreotes P et al. (2006) RacG regulates morphology, phagocytosis, and chemotaxis. *Eukaryot Cell* 5: 1648-1663.

Sonoda S, Nakayama T (2001) Detection of measles virus genome in lymphocytes from asymptomatic healthy children. *J Med Virol* 65: 381-387.

Su Z, Xu P, Ni F (2004) Single phosphorylation of Tyr304 in the cytoplasmic tail of ephrin B2 confers high-affinity and bifunctional binding to both the SH2 domain of Grb4 and the PDZ domain of the PDZ-RGS3 protein. *Eur J Biochem* 271: 1725-1736.

Suksanpaisan L, Susantad T, Smith DR (2009) Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *J Biomed Sci* 16: 17.

Swanepoel R, Leman PA, Burt FJ, Zachariades NA, Braack LE et al. (1996) Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg Infect Dis* 2: 321-325.

Takeda M, Ohno S, Seki F, Hashimoto K, Miyajima N et al. (2005) Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus*



Res 108: 161-165.

Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y (2000) SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406: 893-897.

Thiel L, Diederich S, Erbar S, Pfaff D, Augustin HG et al. (2008) Ephrin-B2 expression critically influences Nipah virus infection independent of its cytoplasmic tail. *Virology* 375: 163.

Towner JS, Pourrut X, Albariño CG, Nkogoue CN, Bird BH et al. (2007) Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS One* 2: e764.

Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB (2008) Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* 1123: 134-145.

Varior-Krishnan G, Trescol-Biémont MC, Nanche D, Rabourdin-Combe C, Gerlier D (1994) Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms of CD46 display similar measles virus receptor properties: virus binding, fusion, and replication; down-regulation by hemagglutinin; and virus uptake and endocytosis for antigen presentation by major histocompatibility complex class II molecules. *J Virol* 68: 7891-7899.

Visser IK, van Bressema MF, van de Bildt MW, Groen J, Orvell C et al. (1993) Prevalence of morbilliviruses among pinniped and cetacean species. *Rev Sci Tech* 12: 197-202.

Visser IK, van der Heijden RW, van de Bildt MW, Kenter MJ, Orvell C et al. (1993) Fusion protein gene nucleotide sequence similarities, shared antigenic sites and phylogenetic analysis suggest that phocid distemper virus type 2 and canine distemper virus belong to the same virus entity. *J Gen Virol* 74 ( Pt 9): 1989-1994.

Vogt C, Eickmann M, Diederich S, Moll M, Maisner A (2005) Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins. *J Virol* 79: 3865-3872.

Wacharapluesadee S, Boongird K, Wanghongsa S, Ratanasetyuth N, Supavonwong P et al. (2009) A Longitudinal Study of the Prevalence of Nipah Virus in *Pteropus lylei* Bats in Thailand: Evidence for Seasonal Preference in Disease Transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis* In press: .

Wacharapluesadee S, Lumlerdacha B, Boongird K, Wanghongsa S, Chanhom L et al. (2005) Bat Nipah virus, Thailand. *Emerg Infect Dis* 11: 1949-1951.

Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ (1998) Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93: 741-753.

Wang L, Harcourt BH, Yu M, Tamin A, Rota PA et al. (2001) Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3: 279-287.

Wang LF, Yu M, Hansson E, Pritchard LI, Shiell B et al. (2000) The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae. *J Virol* 74: 9972-9979.

Weingartl HM, Berhane Y, Caswell JL, Loosmore S, Audonnet J et al. (2006) Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge. *J Virol* 80: 7929-7938.

Weissenhorn W, Hinz A, Gaudin Y (2007) Virus membrane fusion. *FEBS Lett* 581: 2150-2155.

West MA, Bretscher MS, Watts C (1989) Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol* 109: 2731-2739.

White NJ (2007) Cardiotoxicity of antimalarial drugs. *Lancet Infect Dis* 7: 549-558.

Wild TF, Fayolle J, Beauverger P, Buckland R (1994) Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J Virol* 68: 7546-7548.

Wilkinson DG (2003) How attraction turns to repulsion. *Nat Cell Biol* 5: 851-853.

Wong KT, Grosjean I, Brisson C, Blanquier B, Fevre-Montange M et al. (2003) A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. *Am J Pathol* 163: 2127-2137.

Wong KT, Shieh W, Kumar S, Norain K, Abdullah W et al. (2002) Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. *Am J Pathol* 161: 2153-

2167.

Xu X, Subbarao, Cox NJ, Guo Y (1999) Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 261: 15-19.

Yanagi Y, Takeda M, Ohno S (2006) Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87: 2767-2779.

Yanturali S, Aksay E, Demir OF, Atilla R (2004) Massive hydroxychloroquine overdose. *Acta Anaesthesiol Scand* 48: 379-381.

Yob JM, Field H, Rashdi AM, Morrissy C, van der Heide B et al. (2001) Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis* 7: 439-441.

Young PL, Halpin K, Selleck PW, Field H, Gravel JL et al. (1996) Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerg Infect Dis* 2: 239-240.

Zamudio-Meza H, Castillo AM, González-Bonilla C, Meza I (2009) Rac1 and Cdc42 GTPases cross-talk regulates formation of filopodia required for Dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. *J Gen Virol* In press: .

Zenni MK, Giardina PC, Harvey HA, Shao J, Ketterer MR et al. (2000) Macropinocytosis as a mechanism of entry into primary human urethral epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 68: 1696-1699.

ZHANG Y (1997) Distribution of mammalian species in china. China Forestry Publishing House.. p.

Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T et al. (2006) Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 4: 111-121.

Zimmer M, Palmer A, Köhler J, Klein R (2003) EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* 5: 869-878.

## **Référence PDB :**

**1KGY :** Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. Himanen, J.P., Rajashankar, K.R., Lackmann, M., Cowan, C.A., Henkemeyer, M., Nikolov, D.B.(2001) *Nature* **414**: 933-938

**2GUM :** Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. Heldwein, E.E., Lou, H., Bender, F.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Harrison, S.C.(2006) *Science* **313**: 217-220

**1URZ :** Structure of a Flavivirus Envelope Glycoprotein in its Low-Ph-Induced Membrane Fusion Conformation. Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X., Rey, F.A.(2004) *Embo J.* **23**: 728

**1WP8 :** Crystal structure of Hendra virus fusion core. Xu, Y., Liu, Y., Lou, Z., Su, N., Bai, Z., Gao, G.F., Rao, Z. To be Published



## **ANNEXE**

## I-Meeting Reports

### *Nipah virus Colloquium, Kuala Lumpur 2008*

*Neurology Asia 2009; 14 : 71 – 72*

#### **Nipah virus entry into the host cell does not occur by fusion at the plasma membrane but by the endocytic mechanism of macropinocytosis**

Olivier Pernet, Christine Pohl, Michelle Ainouze, Hasan Kweder, Robin Buckland

*INSERM, Virologie Humaine, Lyon, France*

The Henipaviruses Nipah virus (NiV) and Hendra virus (HeV) are zoonotic biosafety level 4 (BSL-4) paramyxoviruses which have emerged respectively in Asia and Australia over the past ten to fifteen years. Despite NiV infection causing a fatal encephalitis in man with up to 92% mortality, and outbreaks occurring in Asia on an annual basis, no anti-viral treatments or prophylaxis are currently available against this dangerous pathogen. Furthermore, the future development of NiV or HeV vaccines is unlikely due to commercial considerations.

There are evidences that NiV enters the host cell by an endocytic route, namely receptor-mediated macropinocytosis. The identification of an endocytic pathway as the method of entry used by NiV is important as it should open the door for the development of a much-needed low-cost antiviral treatment. Hitherto, the Henipaviruses were believed to enter the host cell like other paramyxoviruses – by fusion of the virion envelope with the host cell's plasma membrane at neutral pH. Paramyxovirus entry is thought to be mediated by the concerted action of the viral glycoproteins, the attachment protein (NiV-G in the case of NiV) and the viral fusion protein (NiV-F) following attachment to the receptor. Although the formation of giant multinucleated cells called syncytia (cell-cell fusion involving the plasma membrane) is a hall-mark of NiV infection, our results suggest that NiV entry occurs via fusion with an intracellular membrane following endocytosis rather than directly with the plasma membrane.

The cellular receptor of NiV is ephrinB2 whose cellular function is to act as a ligand for members of the EphB class of receptor tyrosine kinases such as EphB4. Ephrins and Ephs are plasma membrane-bound proteins that play an important role in development. For example, in the case of ephrinB2 and EphB4 they are expressed respectively on venous cells and arterial cells and play an important role in vasculogenesis.

Essentially, when an EphB4-expressing arterial cell encounters another during development of the vascular system the result is adhesion but contact between an EphB4-expressing arterial cell and an ephrinB2-expressing venous cell results in bi-directional *trans*-endocytosis of receptor-ligand complexes and subsequent cellular repulsion. Our results, generated by a combination of mutagenesis, fluorescent tagging and confocal microscopy suggest that the NiV attachment glycoprotein NiV-G mimics EphB4 thereby allowing NiV to enter by a similar mechanism.

After previously mapping the ephrinB2 binding site on the NiV-G globular head we intended to map the NiV-G binding site on ephrinB2 using receptor downregulation as an assay for mutagenesis experiments. In the absence of an effective antibody specific for human ephrinB2 we tagged the receptor with GFP. This strategy has allowed us to show not only that ephrinB2 is internalized upon interaction with NiV-G but also that the two proteins are internalized together into large (more than 0.5µm diameter) intracellular vesicles. The size of these vesicles and the finding that ephrinB2 expression provokes filopodia formation led us to hypothesize that the mechanism involved was macropinocytosis. Macropinocytosis is an active endocytic pathway which is constitutive in dendritic cells and macrophages that serves to take up fluid and exogenous antigens from the extracellular milieu but can also be induced transiently in many cell types by interaction with specific ligands such as epidermal growth factor (EGF). When EGF binds to its receptor EGFR a rapid internalization of both proteins is induced and the resulting intracellular vesicle is sorted to the lysosomes by a kinase-dependent pathway. Importantly, macropinocytosis has been shown to occur in regions of the plasma membrane where ruffling - the formation of lamellipodia and filopodia - is taking place.

Our results suggest that the cytoplasmic

Address correspondence to: Dr Robin Buckland, 'Molecular basis of paramyxovirus entry', INSERM U758 Virologie Humaine, IFR 128 BioSciences Gerland-Lyon Sud, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France

domain of ephrinB2 is required for entry but is dispensable for post-entry virus spread via syncytia formation. Intracellular signaling from the cytoplasmic domain appears to be required as NiV entry is abrogated by the mutation of a single tyrosine residue. Furthermore, we find that NiV entry is Rac1- and Cdc42-dependent. These small GTPases are molecular switches which control the actin cytoskeleton and hence the dynamics of filopodia formation. From our results we hypothesize that when NiV-G (or EphB4) interacts with ephrinB2 a single tyrosine in the cytoplasmic domain becomes phosphorylated triggering a signalling cascade involving Rac1 and Cdc42 which results in the retraction of filopodia necessary for macropinocytosis to occur. Importantly, we find that NiV entry is abrogated by EIPA, an analog of amiloride, which is a specific inhibitor of macropinocytosis. Moreover, the lysosomotropic drug chloroquine (CQ) which acts by raising the pH of subcellular compartments such as late endosomes and lysosomes abrogates NiV entry *in vitro*. Interestingly, the protease cathepsin L which cleaves and activates NiV-F localizes in these cellular compartments and requires a low pH for activity. We hypothesize that by raising the pH, CQ entraps NiV within the intracellular vesicle thus terminating entry. We intend to test both CQ and EIPA *in vivo* using our animal model the hamster and are confident that a novel low-cost antiviral treatment can now be developed not only for NiV but also HeV.

(A paper describing these results has been submitted to PLoS Pathogens and is currently in revision).

## **virus's Achilles' Heel Revealed**

By Martin Enserink  
ScienceNOW Daily News  
18 February 2009



**Vienna, Austria--**Scientists have made a discovery about the basic biology of the Nipah virus, which suggests that cheap, existing drugs for high blood pressure and malaria may help fight the disease. Nipah regularly strikes in rural Bangladesh and neighboring parts of India. The new insights about the deadly pathogen, announced here on 14 February at the International Meeting on Emerging Infectious Diseases and Surveillance, could lead to the first human drug studies within a year, scientists say.

Nipah, which belongs to the Paramyxoviridae family and causes encephalitis, was discovered during an outbreak in 1998 and 1999 in Malaysia and Singapore that killed 106 people and sickened 170 others (*Science*, 16 April 1999, p. 407). Researchers later found that *Pteropus* fruit bats are Nipah's most likely natural reservoir (*Science*, 28 July 2000 p. 518). In Bangladesh, the virus appears to spread via date palm sap, which is collected overnight in clay pots tied around the tree trunk and sold fresh in the morning. Fruit bats are known to visit the trees to feed, and their urine and feces can end up in the pots.

No vaccines or drugs against Nipah exist. But now, a group led by Robin Buckland of INSERM in Lyons, France, may have found Nipah's weak spot. Most researchers have assumed that the virus enters host cells through fusion between the cell's plasma membrane and the virus's envelope--a process that starts when a virus protein called G latches onto a host receptor called ephrinB2. But the INSERM team discovered that instead, the virus enters the cell through macropinocytosis, an ingestion process in which the cell membrane folds inward, engulfing the virus and its receptor in an intracellular vesicle.

Armed with that knowledge, the team tested out three drugs: Amiloride, which is used to treat hypertension and is known to block macropinocytosis; and the antimalarials chloroquine and hydroxychloroquine, which the team suspected might hamstring the virus because they raise the pH in intracellular compartments, including the vesicles created by macropinocytosis. In cell cultures, they found, all three drugs block viral replication efficiently. The team will start testing the drug in hamsters in a few weeks, says Olivier Pernet, a Ph.D. student in the group.

But tests in humans could begin even before the outcomes are known. "We're very excited by these results," says Stephen Luby, who studies Nipah at the International Centre for Diarrhoeal Disease Research in Bangladesh. Luby says he and others are already preparing a study protocol to try at least one of the drugs the next time Nipah strikes.

Given its high fatality rate and the fact that the drugs are quite safe, it probably would be unethical to conduct a randomized trial, in which half of the patients receive a placebo, Luby says. Instead, all of the patients that can be reached would receive treatment, he says, and their recovery rate would be compared with past experience.

<http://sciencenow.sciencemag.org/cgi/content/full/2009/218/1>



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yviro](http://www.elsevier.com/locate/yviro)



1 Nipah virus entry can occur by macropinocytosis

2 Olivier Pernet<sup>1</sup>, Christine Pohl<sup>1</sup>, Michelle Ainouze, Hasan Kweder, Robin Buckland<sup>\*</sup>

3 *Molecular Basis of Paramyxovirus Entry, INSERM U758 Virologie Humaine IFR 128 BioSciences Gerland-Lyon Sud, 21 Avenue Tony Garnier, 69635 Lyon, Cedex 07, France*

4 **ARTICLE INFO**

5 *Article history*  
6 Received 12 August 2009  
7 Returned to a author for revision 27 August 2009  
8 Accepted 14 September 2009  
9 Available online xxxxx

10 **Keywords:**  
11 Nipah virus  
12 Entry  
13 Macropinocytosis  
14 Antivirals

**ABSTRACT**

Nipah virus (NiV) is a zoonotic biosafety level 4 paramyxovirus that emerged recently in Asia with high mortality in man. NiV is a member, with Hendra virus (HeV), of the *Herpavirus* genus in the Paramyxoviridae family. Although NiV entry, like that of other paramyxoviruses, is believed to occur via pH-independent fusion with the host cell's plasma membrane. We present evidence that entry can occur by an endocytic pathway. The NiV receptor ephrinB2 has receptor kinase activity and we find that ephrinB2's cytoplasmic domain is required for entry but is dispensable for post-entry viral spread. The mutation of a single tyrosine residue (Y304F) in ephrinB2's cytoplasmic tail abrogates NiV entry. Moreover, our results show that NiV entry is inhibited by constructions and drugs specific for the endocytic pathway of macropinocytosis. Our findings could potentially permit the rapid development of novel low-cost antiviral treatments not only for NiV but also HeV.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Introduction**

The zoonotic biosafety level 4 (BSL-4) pathogens Nipah virus (NiV) and Hendra virus (HeV) are the sole members of the *Herpavirus* genus in the *Paramyxoviridae* family. NiV first emerged 10 years ago in Malaysia from its reservoir the *Pteropus* fruit bat, infecting successively pigs and humans. When the virus first emerged, NiV-induced encephalitis was responsible for a mortality rate of 40% but latterly annual NiV outbreaks in Bangladesh have occurred in which no intermediate host has been identified and the mortality rate has almost doubled. At present, no antiviral treatments or prophylaxis are available to combat NiV infection. Gaining a better understanding of NiV entry into the host cell is crucial if antivirals inhibiting this process and hence infection are to be identified.

The entry of enveloped viruses into the host cell is believed to occur either by pH-independent fusion of the virion envelope with the plasma membrane or by endocytosis. In the latter case, the acidic pH of the endosome is thought to triggers conformational changes in the fusion protein leading to fusion of the virion and endosomal membranes (Earp et al., 2004). NiV entry has been assumed to occur by the former mechanism, mediated by the concerted action of the viral glycoproteins following receptor attachment. NiV uses both ephrinB2 and ephrinB3 – ligands for members of the EphB class of receptor tyrosine kinases (RTKs) – as receptors for entry (Bonaparte et al., 2005; Negreté et al., 2005, 2006). Importantly, ephrinB2 and ephrinB3 also possess RTK activity. Ephs and ephrins are plasma membrane-bound proteins and consistent with NiV's tropism,

ephrinB2 is expressed on vascular endothelial cells and neurons whereas ephrinB3 expression is limited to cells in particular areas of the CNS such as the *corpus callosum* and the spinal cord.

Although the entry of paramyxoviruses such as NiV has been considered to occur exclusively by fusion at the plasma membrane (Lamb and Kolakofsky, 2001), two recent studies (Cantin et al., 2007; Kolokoltsov et al., 2007) suggest that endocytosis can also play a role in the entry of two paramyxoviruses: caveolae-dependent endocytosis in the case of Newcastle disease virus (NDV) and clathrin-dependent endocytosis for respiratory syncytial virus (RSV). Recently, vaccinia virus, the prototype of the family *Poxviridae*, and human adenovirus of the family *Adenoviridae* have been shown to use macropinocytosis for entry (Amstutz et al., 2008; Mercer and Helenius, 2008). Constitutive macropinocytosis is an active endocytic pathway occurring in macrophages and immature dendritic cells, which serves to take up fluid and exogenous antigens from the extracellular milieu but is also implicated in cell migration (for a review see (Conner and Schmid, 2002; Klasse et al., 1998). In many other cell types macropinocytosis can be induced transiently by interaction of receptors with specific ligands. For example, binding of epidermal growth factor (EGF) to its receptor EGFR induces rapid internalization of both proteins and intracellular sorting to the lysosomes by a kinase-dependent pathway (Kornilova et al., 1996). Moreover, macropinocytosis occurs in regions of the plasma membrane where the formation of lamellipodia and filopodia is taking place (for a review, see Klasse et al., 1998). A recent review on viral entry by macropinocytosis (Mercer and Helenius, 2008) discusses the molecular machinery involved in this endocytic pathway and the criteria by which it can be characterized. Here, we show that both in Vero cells and CHO-K1 cells expressing human ephrinB2 entry by the paramyxovirus NiV occurs not by fusion at the

<sup>\*</sup> Corresponding author.  
Email address: [robin.buckland@inserm.fr](mailto:robin.buckland@inserm.fr) (R. Buckland).  
<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.



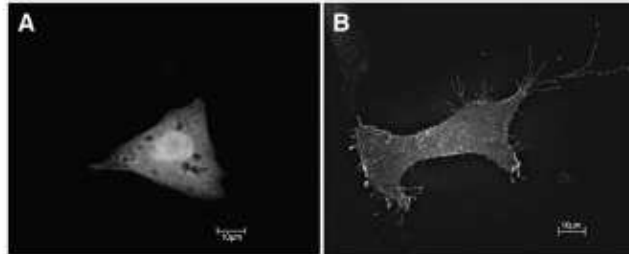


Fig. 1. ephrinB2 induces filopodia formation. CHO cells were transfected with either 1 µg of pcGFP-N1 (A) or 1 µg of pcGFP-N1-ephrinB2 (B) and observed by conventional fluorescent microscopy.

91 plasma membrane but by an endocytic mechanism that fit criteria  
92 defining macropinocytosis.

### 93 Results

#### 94 ephrinB2 induces filopodia formation and is endocytosed by NIV-G

95 The original aim of this study was to investigate whether ephrinB2  
96 is downregulated from the cell surface upon infection. We had  
97 previously mapped the ephrinB2 binding site on the NIV-G globular  
98 head (Guillaume et al., 2006) and endeavored to map the NIV-G  
99 binding site on ephrinB2 by using receptor downregulation as a  
100 handle. We anticipated that ephrinB2 could be downregulated by  
101 NIV-G because members of the *Morbivirinae* genus, the only  
102 paramyxovirus genus other than the *Henipaviruses* to use cellular  
103 proteins as receptors rather than sialic acid, internalize their receptors  
104 upon infection. A major problem in studying ephrinB2 downregulation  
105 is the lack of an adequate  $\alpha$ -human-ephrinB2 antibody, probably  
106 explained by the very high level of conservation between human and  
107 murine ephrinB2. To overcome this difficulty, we used a recombinant  
108 system tagging human ephrinB2 with eGFP by subcloning the  
109 ephrinB2 gene into the pcGFP-N1 expression vector that we used to  
110 transfect (ephrinB2-negative) CHO-K1 cells. In contrast to the  
111 expression of eGFP (Fig. 1A), we found that the expression of  
112 ephrinB2-eGFP induced the formation of multiple extended ramified  
113 filopodia (Fig. 1B). This finding is in agreement with a previous report  
114 that expression of murine ephrinB2 in B16 melanoma cells induces  
115 the formation of filopodia thereby enhancing cell migration (Meyer  
116 et al., 2005).

117 Using confocal microscopy analysis, we found that when ephrinB2  
118 tagged with eGFP (green) was co-expressed with mRFP (red) in CHO-  
119 K1 cells, the ephrinB2 was present in the plasma membrane, in  
120 particular at the level of the numerous filopodia, but there was no  
121 colocalization with mRFP whose expression was cytoplasmic (Fig. 2A,  
122 top). However, when ephrinB2-eGFP was co-expressed with NIV-G  
123 mRFP, the two proteins were endocytosed, colocalizing in intracellular  
124 vesicles and the number of filopodia appeared to be reduced  
125 (Fig. 2A, middle). Expression of mRFP-tagged NIV-G was verified by  
126 flow cytometry, and its fusion promotion capacity by co-expression  
127 with NIV-F (Figs. S1A and B). Furthermore, soluble murine EphB4-Fc  
128 was used to demonstrate that its surface expression was equivalent to  
129 that of non-tagged ephrinB2 (Fig. S3). As our previous results had  
130 shown that residue E533 of NIV-G is crucial for the interaction with  
131 ephrinB2 (Guillaume et al., 2006), we also co-expressed the NIV-G

132 E533Q-mRFP mutant with ephrinB2-eGFP. In this case, smaller vesicles  
133 with much lower levels of colocalization were observed and the  
134 number of filopodia appeared to be unaffected (Fig. 2A bottom).

135 As these results appear to show that ephrinB2 is endocytosed from  
136 the cell surface following contact with NIV-G, we began to consider  
137 the possibility that the whole virus could enter the host cell by the  
138 same mechanism. Thus, it was important to determine whether  
139 intracellular vesicles were also formed when ephrinB2 and NIV-G  
140 were expressed on opposing cells. For this, cocultures were made of  
141 NIV-G-expressing CHO cells with CHO cells expressing either eGFP or  
142 ephrinB2-eGFP. Even when in close proximity, there was no transfer of  
143 NIV-G to eGFP-expressing CHO cells (Fig. 2B, top). In contrast, in  
144 cocultures of NIV-G- and ephrinB2-expressing CHO-K1 cells both  
145 proteins were found to colocalize in large vesicles in ephrinB2-  
146 expressing cells as well as in NIV-G-expressing cells (Fig. 2B, bottom).  
147 In this experiment, NIV-G was stained intracellularly using an anti-  
148 NIV-G monoclonal antibody (5A7) and a secondary goat- $\alpha$ -mouse  
149 antibody conjugated with Alexa568 (red), but identical results were  
150 obtained with NIV-G-mRFP (not shown).

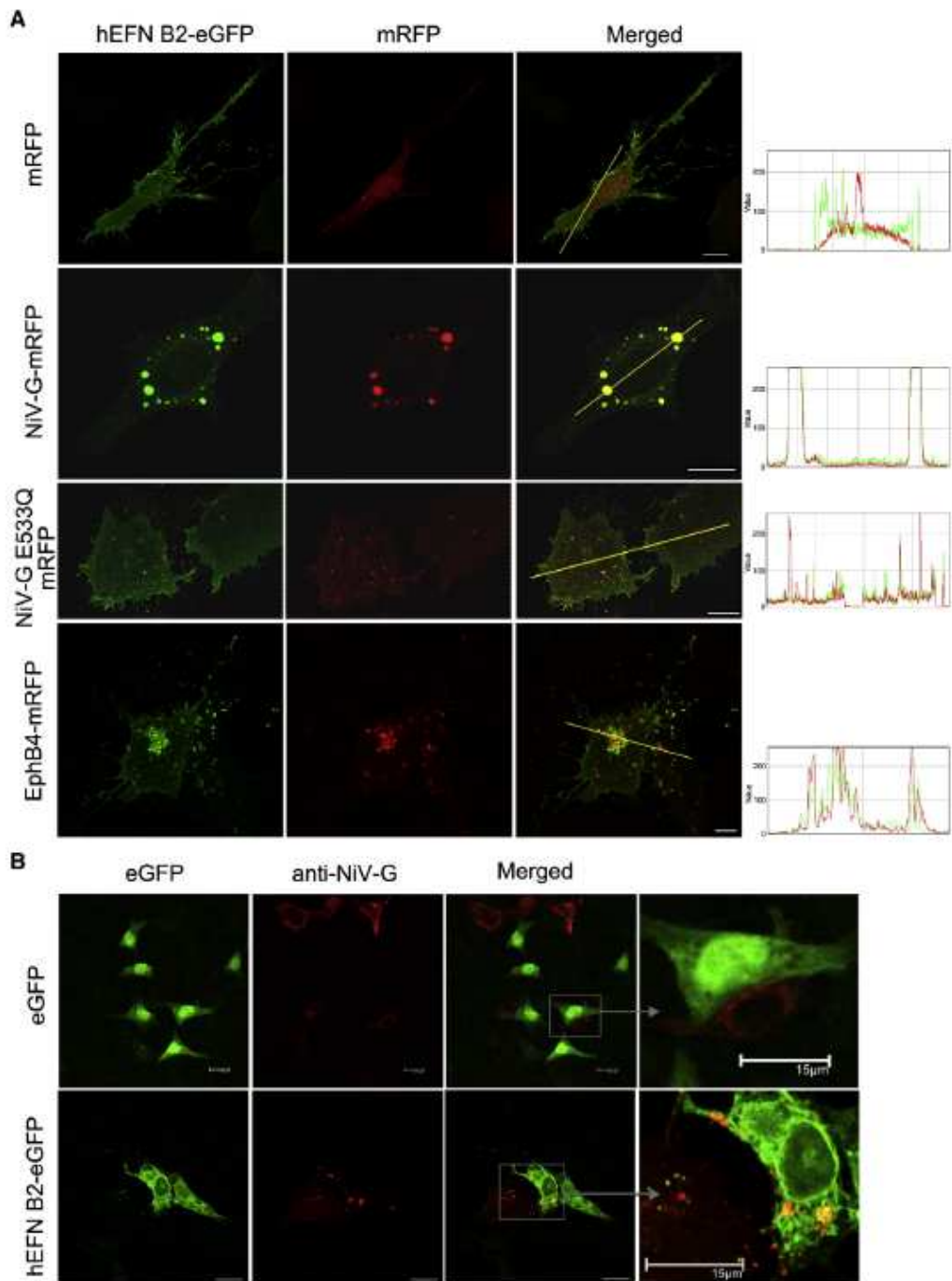
#### 151 The intracellular vesicles containing ephrinB2 and NIV-G traffic to the 152 lysosomes

153 Time-lapse microscopy of CHO cells expressing ephrinB2-eGFP  
154 and NIV-G shows trafficking of incoming vesicles towards the center  
155 of the cell (Video S1). As a particular type of endocytic vesicle – the  
156 macropinosome – has been shown to traffic and fuse with lysosomes  
157 (Racoosin and Swanson, 1993), we decided to investigate whether  
158 this fate befell intracellular vesicles containing ephrinB2 and NIV-G.  
159 To determine this, CHO-K1 cells co-expressing ephrinB2-eGFP and  
160 NIV-G tagged with eCFP were stained with LysoTracker Red, a dye  
161 specific for the lysosomal compartment. The majority of vesicles  
162 containing both ephrinB2-eGFP (green) and NIV-G-eCFP (cyan-blue)  
163 co-stained with LysoTracker (red) (Fig. 3). The enlargement (Fig. 3,  
164 right) shows typical lysosomes (indicated by arrows) in proximity  
165 with giant intracellular vesicles containing ephrinB2 and NIV-G.  
166 Expression of eCFP-tagged NIV-G was verified by flow cytometry and  
167 its fusion promotion capacity by co-expression with NIV-F (Figs. S1A  
168 and B). Lamp1 is a membrane protein marker of late endosomes/  
169 lysosomes and similar results were obtained with an anti-Lamp1  
170 antibody/Alexa568 staining (Fig. S6).

171 Taken together, our results strongly suggest that the intracellular  
172 vesicles containing ephrinB2 and NIV-G are endocytic – possibly  
173 macropinocytic – and traffic to the lysosomes.

Fig. 2. Co-expression of NIV-G and ephrinB2-eGFP leads to the *Janus*'s internalization. (A) CHO cells were transfected with 1 µg of pcGFP-N1-ephrinB2 and either 1 µg pcDNA3.1, pcDNA3.1-NIV-G-mRFP, pcDNA3.1-NIV-G(E533Q)-mRFP or pcDNA3.1-EphB4-mRFP. Cells were then observed by confocal microscopy and the fluorescence profile along the yellow line quantified. (B) Populations of CHO cells expressing either eGFP (upper panel) or ephrinB2-eGFP (lower panel) were mixed with a population of CHO cells expressing NIV-G and co-cultivated for 24 h prior to NIV-G staining of fixed permeabilized cells and confocal microscopic analysis for trans-internalization of ephrinB2-eGFP and NIV-G-mRFP. Images on the right hand side are enlargements of the images on the left. Scale bar: 15 µm.

Please cite this article as: Pernet, O., et al. Nipah virus entry can occur by macropinocytosis. *Virology* (2009), doi:10.1016/j.virol.2009.09.016



Please cite this article as: Pernet, O., et al., Nipah virus entry can occur by macropinocytosis, *Virology* (2009), doi:10.1016/j.virol.2009.09.016

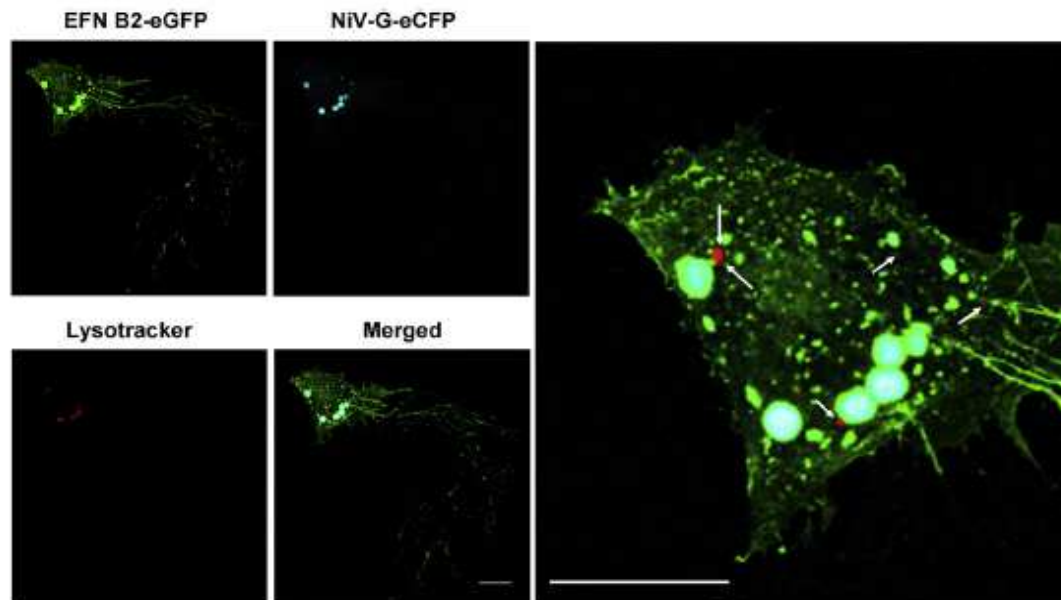


Fig. 3. EphrinB2 and NiV-G colocalize in large vesicles that traffic to lysosomes. CHO cells co-expressing ephrinB2-eGFP and NiV-G-eCFP were treated with Lysotracker Red 24 h p.t., fixed and analyzed by confocal microscopy. Arrows indicate typical lysosomes. The image on the right is an enlargement of the merged image on the left, bottom panel. Scale bar: 20  $\mu$ m.

174 VLPs expressing NiV-G or NiV-G/F/M enter cells by the same mechanism  
175 as NiV-G

176 We next wanted to investigate whether the interaction between  
177 NiV-G and ephrinB2 would allow whole virus to enter by this  
178 endocytic mechanism but were unable to make confocal microscope  
179 studies with live NiV outside of the BSL-4 laboratory. To overcome this  
180 difficulty, we generated virus-like particles (VLPs) expressing NiV-G  
181 either alone or in combination with NiV-F and NiV-M. It has been  
182 shown that expression of individual NiV proteins (for example NiV-G)  
183 from plasmids can drive the formation of VLPs that are released into  
184 culture supernatants (Patch et al., 2007). Furthermore, the co-  
185 expression of NiV-G and NiV-F together with NiV-M leads to the  
186 production of VLPs that have the size and characteristics of authentic  
187 virus (Patch et al., 2007). It was particularly important to include NiV-  
188 F to study if VLPs containing the two NiV glycoproteins would fuse  
189 with the plasma membrane rather than enter endocytically. Thus, a  
190 western blot was made to confirm the presence of NiV-G and NiV-F in  
191 the latter VLPs (Fig. S4). We used the Patch protocol (Patch et al.,  
192 2007) as a basis to produce the VLPs which, labeled with octadecyl  
193 rhodamine B (R18) a lipophilic red fluorescent membrane dye,  
194 were added to cells expressing either eGFP or ephrinB2-eGFP (Fig. 4).  
195 CHO-K1 cells expressing eGFP did not bind NiV-G-expressing VLPs  
196 (Fig. 4A), whereas binding as well as internalization of VLPs was  
197 observed with ephrinB2-expressing cells (Figs. 4B and C). VLPs were  
198 found in association with filopodia and in large intracellular vesicles  
199 where they colocalized with ephrinB2-eGFP (Fig. 4B). In later stages of  
200 the uptake process, ephrinB2-eGFP and NiV-G-containing VLPs  
201 colocalized entirely in large intracellular vesicles (Fig. 4C). Similar  
202 results were obtained with VLPs produced by the co-expression of  
203 NiV-G, NiV-F and NiV-M, with no evidence of R18 coloration of the  
204 plasma membrane (Fig. 4D). These results led us to hypothesize that  
205 NiV can enter cells via an endocytic mechanism.

174 Mutation of ephrinB2 residues responsible for interaction with EphB4  
175 abrogates NiV entry

176 Interestingly, ephrinB2 and its cognate receptor EphB4 are also  
177 co-endocytosed into intracellular vesicles following their interaction  
178 on opposing plasma membranes (Marston et al., 2003). We  
179 confirmed this by tagging mEphB4 with mRFP and showing that  
180 it is co-endocytosed with ephrinB2 in the same manner as NiV-G  
181 (Fig. 2). This result led us to hypothesize that NiV could gain entry  
182 into the host cell by NiV-G mimicking EphB4's interaction with  
183 ephrinB2. To test this, we investigated the effect on NiV entry of  
184 mutating residues in the solvent-exposed G<sub>1</sub>-H loop of ephrinB2  
185 shown in a co-crystallization study (Chrencik et al., 2006) to be  
186 responsible for the interaction with EphB4. To evaluate this, we  
187 used NiV cell-cell fusion as a read-out for NiV entry. Cell-cell fusion  
188 (syncytia formation) is the hallmark of NiV infection and is  
189 dependent upon viral entry. If the virus enters, by whatever  
190 mechanism, viral replication ensues and *de novo* synthesized NiV  
191 glycoproteins G and F accumulate in the infected cell's plasma  
192 membrane inducing syncytia formation by fusion with surrounding  
193 cells. Quantification was made by expressing the number of nuclei  
194 present in syncytia as a percentage of the total number of nuclei, as  
195 previously described (Guillaume et al., 2006). To ensure that the  
196 mutations do not have an inhibitory effect on the viral fusion  
197 process *per se*, we also tested their effect on cell-cell fusion induced  
198 by the viral glycoproteins G and F expressed from plasmids. The  
199 expression and localization of all ephrinB2 mutants was verified by  
200 flow cytometry and conventional microscopy (Figs. S2A and B).  
201 If NiV-G mimics EphB4, mutations in the G<sub>1</sub>-H loop should abrogate  
202 the interaction ephrinB2/NiV-G blocking in turn NiV entry and NiV-  
203 induced cell-cell fusion. We found that this was indeed the case. Two  
204 single mutations, F120A and W125A, reduced cell-cell fusion (not  
205 shown) whereas the quadruple mutation of F120, N123, W125 and

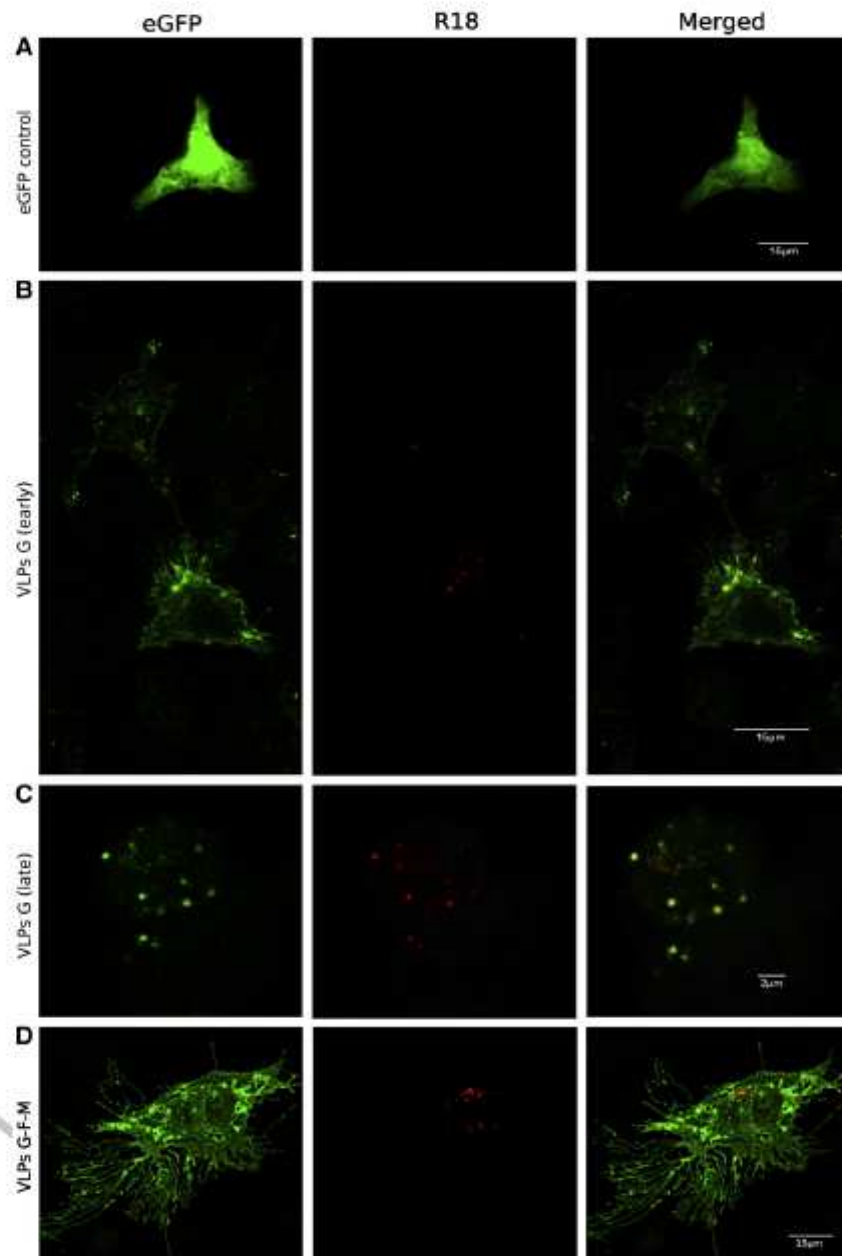
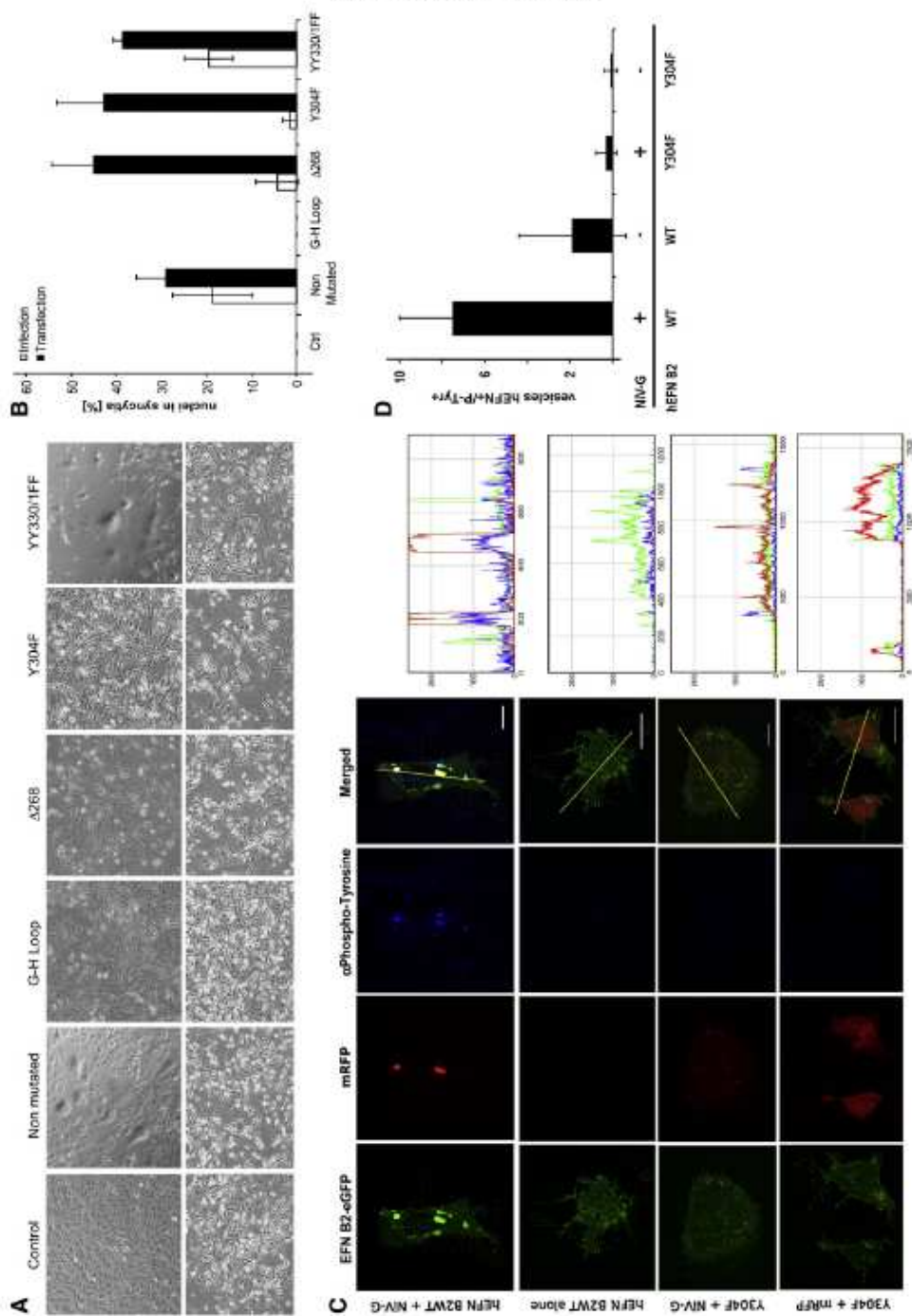


Fig. 4. NIV-G-containing VLPs are internalized into large vesicles in ephrinB2-expressing cells. Virus-like particles (VLPs) produced from CHO cells expressing NIV-G were labeled with the fluorescent membrane dye R18 and added to CHO-K1 cells expressing either eGFP or ephrinB2-eGFP for 1 h at 37 °C. After extensive washing, cells were fixed and analyzed by confocal microscopy to determine the localization of the VLPs. (A) NIV-G-expressing VLPs do not localize in eGFP-expressing CHO cells. (B) NIV-G-expressing VLPs bind to the filopodia of ephrinB2-eGFP-expressing cells and (C) are internalized. (D) The same experiment performed with VLPs containing NIV-M, NIV-F and NIV-G.

Please cite this article as: Pernet, O., et al., Nipah virus entry can occur by macropinocytosis, *Virology* (2009), doi:10.1016/j.virol.2009.09.016

6

G. Pernet et al. / *Virology xxx (2009) xxx-xxx*



Please cite this article as: Pernet, O., et al, Nipah virus entry can occur by macropinocytosis, *Virology* (2009), doi:10.1016/j.virol.2009.09.016

254 L127 to alanine resulted in an abrogation of fusion (Figs. 5A and B).  
 255 These results demonstrate that the same domain of the G-H loop of  
 256 ephrinB2 is responsible for the interaction with both EphB4 and NiV-G.

#### 258 Endocytic entry by NiV does not require low pH

259 We next used the lysotropic drug chloroquine (CQ), which  
 260 raises the pH of late endosomes and lysosomes, to investigate  
 261 whether the potential endocytic entry by NiV is dependent (as is  
 262 the case for the vast majority of viruses that enter by receptor-  
 263 mediated endocytosis) on the acidic conditions found in late  
 264 endosomes and lysosomes. We found that 100  $\mu$ M CQ reduced the  
 265 number of NiV plaques in the plaque assay by 100% but importantly  
 266 cell-cell fusion induced by transient co-expression of the NiV  
 267 glycoproteins was also completely abrogated (not shown). Interest-  
 268 ingly, further investigation revealed that NiV glycoproteins were  
 269 present in the plasma membrane of the infected cells (Fig. S5) treated  
 270 with CQ. This suggests that low pH is not required to allow NiV to exit  
 271 from the endocytic vesicle and replicate but that cleavage of the NiV-F,  
 272 catalyzed by the low pH requiring protease cathepsin L (Pager and  
 273 Dutch, 2005), is inhibited under these conditions. Our results confirm  
 274 and extend the results of a recent study (Porrotto et al., 2009) which  
 275 identified CQ as an inhibitor of henipavirus replication via a high-  
 276 throughput screening assay using recombinant vesicular stomatitis  
 277 virus (VSV) pseudotyped with HeV-G and NiV-F.

#### 278 Interaction of NiV-G with ephrinB2 induces phosphorylation of tyrosine 279 residues in ephrinB2's cytoplasmic tail

280 The cytoplasmic tail of ephrinB2 mediates reverse signaling via  
 281 protein-protein interactions with intracellular proteins (Cowan and  
 282 Henkemeyer, 2001; Lu et al., 2001). Upon interaction with Ephs,  
 283 ephrins become phosphorylated at cytoplasmic tyrosine residues  
 284 within the 22 residue region between residues 301 and 322 which  
 285 allows the recruitment of the adaptor protein Grb4 that transduces  
 286 the signal to downstream signaling cascades regulating cytoskeleton  
 287 dynamics (Cowan and Henkemeyer, 2001; Holland et al., 1996). We  
 288 thus investigated whether the contact of NiV-G with ephrinB2 induces  
 289 the phosphorylation of tyrosine residues in ephrinB2's cytoplasmic  
 290 tail. We did this by co-expressing NiV-G-mRFP and ephrinB2-eGFP in  
 291 CHO-K1 cells and then staining with an  $\alpha$ -phosphotyrosine antibody.  
 292 The quantification trace shows that phosphotyrosine staining only  
 293 occurred in vesicles in which ephrinB2 and NiV-G colocalized whereas  
 294 in cells not transfected with NiV-G phosphotyrosine staining was  
 295 scattered in small punctuations (Fig. 5C). These results suggest the  
 296 possibility that ephrinB2 cytoplasmic domain tyrosines are phos-  
 297 phorylated following contact with NiV-G.

#### 298 A single tyrosine mutation (Y304F) in the ephrinB2 cytoplasmic region 299 virtually abrogates NiV entry

300 We next investigated whether phosphorylation of ephrinB2  
 301 following interaction with NiV-G was relevant to entry of the whole  
 302 virus. To investigate whether tyrosine residues present in the  
 303 ephrinB2 cytoplasmic tail play a role in NiV entry, we first truncated  
 304 ephrinB2's cytoplasmic tail at serine 268. By using cell-cell fusion as a  
 305 read-out for NiV entry, we found that this truncation drastically

306 reduced NiV entry, and hence fusion. However, this truncation did not  
 307 effect cell-cell fusion induced by transient co-expression of the NiV  
 308 glycoproteins (Figs. 5A and B).

309 Next, all six tyrosine residues present in the cytoplasmic tail were  
 310 mutated individually to phenylalanine (which lacks the hydroxyl  
 311 group on the phenyl ring that allows tyrosine to be phosphorylated).  
 312 Mutation of the two tyrosine residues present at the C-terminus, Y330  
 313 and Y331, had no effect (Figs. 5A and B) and a similar result was  
 314 obtained mutating Y311, Y316, and Y252 (not shown) but the Y304F  
 315 mutation caused a 98% reduction in NiV-induced cell-cell fusion  
 316 without having any negative effect on cell-cell fusion induced by  
 317 transient co-expression of the NiV glycoproteins (Figs. 5A and B).  
 318 Furthermore, we found that the number of NiV-G/ephrinB2 vesicles  
 319 staining positive for phosphotyrosine was more than 90% reduced in  
 320 CHO cells expressing the Y304F mutant of ephrinB2 rather than the wt  
 321 protein (Fig. 5D). The quantification graph confirms that strong  
 322 localization of ephrinB2 (green) and  $\alpha$ -phosphotyrosine (blue) only  
 323 occurs where NiV-G (red) fluorescence increases (Fig. 5C Graph).  
 324 Interestingly, the Y304F mutant still localizes with NiV-G but can not  
 325 be phosphorylated (phosphotyrosine signal absent) or internalized  
 326 into large vesicles (Figs. 5C and D). These results strongly suggest that  
 327 phosphorylation of Y304 plays an important role in NiV entry.

328 If NiV entry is dependent upon phosphorylation of tyrosines in the  
 329 ephrinB2 cytoplasmic tail, this raises the possibility of blocking NiV  
 330 entry by inhibiting tyrosine kinase activity. We thus examined the  
 331 effect of the broad-spectrum tyrosine kinase inhibitor genistein using  
 332 a plaque assay. We found that 50  $\mu$ M of genistein resulted in a  
 333 statistically significant reduction (22%;  $p < 0.05$ ) in the number of NiV  
 334 plaques (Fig. 6A) but had little effect on cell-cell fusion induced by  
 335 transfection of plasmids expressing NiV-G and NiV-F (Fig. 6B).  
 336 Although the pleiotropic and toxic nature of this broad-spectrum  
 337 inhibitor has to be taken into account, these results imply that  
 338 tyrosine kinase activity plays a role in NiV entry.

339 Taking our results together with the Klein group's study of EphB-  
 340 ephrinB bi-directional endocytosis (Zimmer et al., 2003) led us to  
 341 hypothesize that the endocytic pathway used by NiV for entry could  
 342 be macropinocytosis. We thus tested the effect of a number of known  
 343 inhibitors of viral entry by macropinocytosis (Mercer and Helenius,  
 344 2008) on the entry of NiV.

#### 345 Dominant-negative mutants of Rac1 and Cdc42 reduce cell-cell fusion 346 induced by NiV but the RhoA dominant-negative mutant has no effect

347 The Rho subfamily small GTPases Rac1 and Cdc42, whose  
 348 expression induces the production of lamellipodia and filopodia  
 349 respectively, have been implicated in the control of macropinocytosis  
 350 (Garrett et al., 2000; West et al., 2000). In a preliminary investigation,  
 351 we tested the effect of Toxin B (from *Clostridium difficile*) a mono-  
 352 glucosyltransferase known to inhibit Rho subfamily GTPases  
 353 (Aktories and Barbieri, 2005) on NiV entry. We found that 80 mM  
 354 Toxin B reduced the number of NiV plaques by 50% (Fig. 6A) but had  
 355 little effect on cell-cell fusion induced by transient co-expression of  
 356 the NiV glycoproteins (Fig. 6B). However, for the reason that Toxin B  
 357 probably has a pleiotropic effect on cells, we targeted Rac1 and Cdc42  
 358 directly. According to a recent review on viral entry by macro-  
 359 pinocytosis (Mercer and Helenius, 2008), infection by macropinocy-  
 360 tosis depends upon Rac1 and Cdc42 but not RhoA. We found this to be

Fig. 5. NiV entry requires tyrosine 304 in the ephrinB2 cytoplasmic domain. (A) CHO cells transfected to express ephrinB2-eGFP (non-mutated), ephrinB2-eGFP with four C-H loop residues mutated (F120, N123, W125, L127/AAAA), ephrinB2 lacking the cytoplasmic tail ( $\Delta$ 268) or with cytoplasmic tail tyrosine residues mutated to phenylalanine (Y304F, Y330/1FF). Cells were either infected with NiV (200 PFU/well) 24 h p.i. (upper panel) or co-transfected with pCMV-NiV-G and pCMV-NiV-F (lower panel). Cells were examined 48 h p.i. or p.t. for syncytia formation. (B) Cell-to-cell fusion in Fig. 4A experiments was quantitatively analyzed and is expressed as the ratio of nuclei in syncytia to total nuclei in three randomly selected images. Experiments were performed in triplicate and data are represented as the standard deviation of the mean. (C) ephrinB2 is phosphorylated upon interaction with NiV-G. Upper panels: CHO cells expressing ephrinB2-eGFP with or without NiV-G-mRFP were fixed, permeabilized, stained with an  $\alpha$ -phosphotyrosine antibody and a secondary antibody, goat- $\alpha$ -mouse-Alexa647, and then analyzed by confocal microscopy. Lower panels: the same experiment made with ephrinB2.Y304F. Scale bar: 15  $\mu$ m. (D) Effect of ephrinB2 Y304F mutation on colocalization of ephrinB2 and anti-phosphotyrosine, with and without NiV-G, in intracellular vesicles. The number of ephrinB2<sup>+</sup>/anti-phosphotyrosine<sup>+</sup> vesicles per cell was counted. For each set, 10 cells were analyzed and data are represented as the standard deviation of the mean.

Please cite this article as: Pernet, O., et al., Nipah virus entry can occur by macropinocytosis, Virology (2009), doi:10.1016/j.virol.2009.09.016

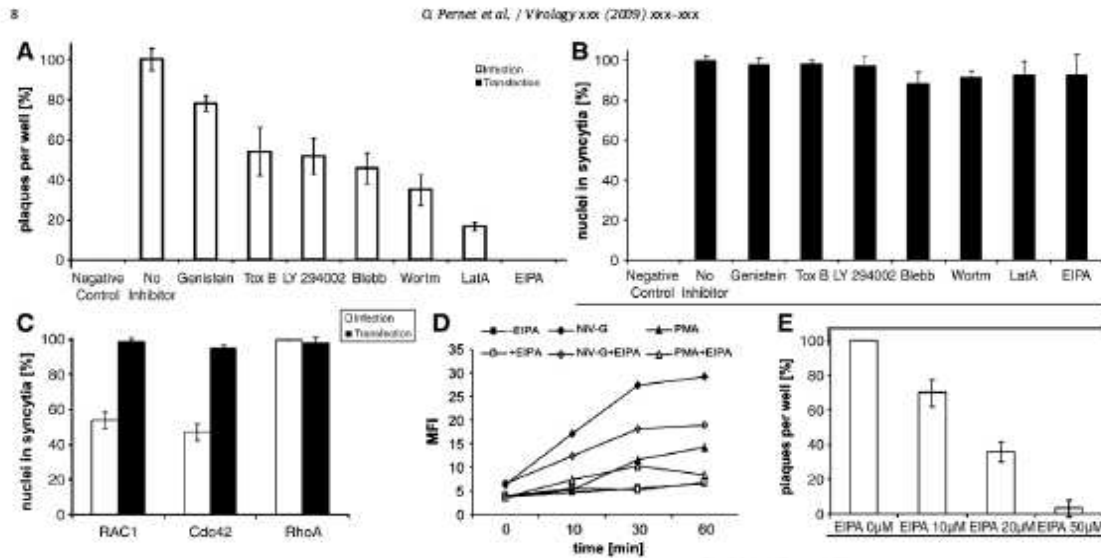


Fig. 6. NIV entry is dependent on macropinocytosis. Vero cells were either (A) infected with NIV or (B) co-transfected with pCMV-NIV-G and pCMV-NIV-F in the presence or absence of 100 μM 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA), 80 μM Toxin B (Tox B), 50 μM genistein, 100 μM LY294002, 50 μM blebbistatin (Blebb), 50 nM wortmannin (Wort) and 2 μM latrunculin A (LatA). (A) Virus entry was evaluated by plaque assay after 72 h p.i., and (B) fusion activity by cell-cell fusion assay 48 h p.i. (C) Dominant-negative mutants N17Kac1-eGFP, N17Cdc42-eGFP or N19RhoA were expressed in Vero cells 24 h before infection by NIV or co-transfected with NIV-G and NIV-F. Syncytia formation was quantified as described above 24 h p.i. or 48 h p.i., respectively. Experiments were performed in triplicate and data are represented as the standard deviation of the mean. (D) FITC-Dextran uptake by NIV-G-expressing Vero cells is inhibited by EIPA in a fluid uptake assay. Vero cells, expressing either NIV-G, treated with PMA (positive control) or left untreated, were incubated with FITC-Dextran for the indicated time points. Uptake of FITC-Dextran was analyzed by flow cytometry and is indicated by the mean fluorescence intensity (MFI). One representative experiment out of three is shown. (E) EIPA dose effect on virus entry was evaluated by plaque assay after 72 h p.i.

381 the case. Expression of the dominant-negative mutant of RhoA had no  
382 effect on NIV-induced cell-cell fusion but expression of the  
383 dominant-negative mutants of Rac1 or Cdc42 led to a reduction of  
384 by 46% and 53%, respectively (Fig. 6C). In contrast, the Rac1 and Cdc42  
385 mutants had no or minimal effect on cell-cell fusion induced by  
386 transient co-expression of the NIV glycoproteins (Fig. 6C). These  
387 results give strong support to the hypothesis that NIV entry occurs via  
388 macropinocytosis.

#### 389 PI(3)K inhibitors reduce NIV entry

390 As Ras activation by receptor tyrosine kinases initiates the  
391 phosphatidylinositol-3-kinase (PI(3)K) signaling pathway which  
392 modulates the closure of macropinosomes, the PI(3)K inhibitors  
393 wortmannin and LY294002 should have an effect on viral entry if this  
394 occurs by macropinocytosis (Mercer and Helenius, 2008). We found  
395 that this was indeed the case; wortmannin and LY294002 reduced the  
396 number of NIV plaques in our plaque assay by 65% and 48%,  
397 respectively (Fig. 6A). Moreover, we found that the small molecule  
398 blebbistatin, a specific inhibitor of myosin II (required to effect the  
399 closure of macropinosomes) reduced NIV plaque numbers by 54%  
400 (Fig. 6A).

#### 401 Latrunculin A strongly inhibits NIV entry

402 Macropinosome formation is an actin-based process. Thus, viral  
403 entry and infection via macropinocytosis should be sensitive to  
404 inhibitors of actin dynamics such as the compound Latrunculin A  
405 (Mercer and Helenius, 2008). We found that Latrunculin A, which  
406 inhibits the polymerization of actin, reduced the number of NIV  
407 plaques in our plaque assay by 83% (Fig. 6A). This result provides  
408 critical evidence that NIV entry occurs via macropinocytosis.

#### Amiloride abrogates NIV entry

409 Finally, we tested the effect of amiloride a specific inhibitor of  
410 macropinocytosis which acts by blocking the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange  
411 required for macropinocytosis to occur (West et al., 1989). Fluid  
412 uptake by cells via macropinocytosis can be monitored by the use of  
413 the fluid phase marker 70-kDa dextran (Mercer and Helenius, 2008).  
414 We hypothesized that if the NIV-G/ephrinB2 interaction induces  
415 macropinocytosis, the transient expression of NIV-G in cells permis-  
416 sive for NIV should result in an uptake of 70-kDa dextran that would  
417 be sensitive to ethyl isopropyl amiloride (EIPA). We found that this  
418 was indeed the case: expression of NIV-G in Vero cells resulted in a  
419 steady increase in the uptake of 70-kDa FITC-dextran over 60 min as  
420 measured by flow cytometry and treatment with 100 μM EIPA  
421 reduced this uptake by more than 35% (Fig. 6D). Moreover, we found  
422 that 100 μM EIPA reduced NIV plaque numbers in a plaque assay by  
423 100% (Fig. 6A) but had minimal effects on cell-cell fusion induced by  
424 the transient co-expression of the NIV glycoproteins (Fig. 6B). When  
425 we investigated the effect of lower EIPA concentrations in the plaque  
426 assay, we found that the number of plaques (pfu) formed was  
427 inversely proportional to the EIPA concentration (Fig. 6E).

#### Discussion

428 The major conclusion from this study is that NIV can enter the host  
429 cell by receptor-mediated endocytosis and that the particular endocytic  
430 pathway used is macropinocytosis. To our knowledge, this is the first  
431 demonstration of paramyxovirus entry by macropinocytosis—the vast  
432 majority are assumed to enter the host cell by fusion (at neutral pH) at  
433 the plasma membrane. Moreover, our results obtained with the  
434 lysomotropic drug chloroquine suggest that the endocytic pathway  
435 used by NIV does not depend upon low pH, an entry mechanism that  
436

few viruses are known to utilize. Our results suggest that NIV achieves endocytic entry by virtue of its attachment protein NIV-G mimicking the interaction of EphB4 with its ligand ephrinB2. Importantly, both EphB4 and ephrinB2 have receptor tyrosine kinase (RTK) activity and are implicated in numerous cellular processes important in development. Notably, they are expressed respectively on venous and arterial endothelial cells. During vasculogenesis, their interaction ensures that repulsion rather than adhesion occurs when a venous cell encounters an arterial cell. Repulsion is achieved by bi-directional trans-endocytosis of the intact EphB4-ephrinB2 complex that is concomitant with depolymerization of the actin skeleton and retraction of filopodia and lamellipodia. This mechanism strongly resembles receptor-mediated macropinocytosis (Wilkinson, 2003).

Recent publications have already hinted that endocytosis is involved in *Henipavirus* replication although the mechanism by which this is achieved and indeed its significance, have remained obscure. The first indication was the finding that the protease Cathepsin L, which localizes to low pH late endosomes and lysosomes, is responsible for the proteolytic processing of both the HeV-F protein (Pager and Dutch, 2005) and NIV-F (Himanan et al., 2001). Another study using transient expression of HeV glycoproteins in Vero cells found that expression of dominant-negative mutants of GTPases Rac1 and Cdc42 had little effect on cell-cell fusion induced by plasmids expressing NIV-G and NIV-F (Schowalter et al., 2006), but these authors did not investigate the effect of these mutants on cell-cell fusion induced by the virus. Finally, a recent publication (Diéderich et al., 2008) reported that NIV can be endocytosed but the authors – who did not test any inhibitors of receptor-mediated macropinocytosis and did not demonstrate NIV-G-induced ephrinB2 downregulation – concluded that endocytosis is ‘definitely not required for the NIV entry process’. We believe that this conclusion is emphatically contradicted by our results.

In effect, our preliminary findings show that when ephrinB2 and NIV-G are expressed on opposing cells, both proteins are trans-endocytosed into intracellular vesicles which are then transported towards the lysosomes. Not only does this demonstrate, for the first time, that the NIV receptor is internalized from the cell surface upon interaction with NIV-G but also suggests that NIV-G can potentially mimic EphB4’s interaction with ephrinB2 and thereby allow NIV to enter by the same endocytic mechanism. Hitherto, the question of ephrinB2 downregulation by NIV-G has been controversial. A recent report (Sawatsky et al., 2007) concluded that both the expression of NIV-G and NIV infection had no effect on the cell-surface expression of ephrinB2. We found this result surprising because the closely related Morbilliviruses internalize their receptors upon infection. Viruses of the Morbillivirus genus and the *Henipavirus* genus differ from the other paramyxoviruses in that they use cellular proteins as receptors rather than sialic acid and for the Morbillivirus measles virus (MV) it has been shown that its two known receptors, CD46 and SLAM (CD150), are downregulated from the cell surface upon infection (Naniche et al., 1993; Tanaka et al., 2002). Moreover, ephrinB2 downregulation could potentially be responsible for the vasculitis that characterizes NIV pathogenesis in particular encephalitis, as vascular smooth muscle mural cells require ephrinB2 for their association with small diameter blood vessels (Foo et al., 2006).

Our finding that expression of ephrinB2 provokes the formation of extensive polarized filopodia was an initial indication that macropinocytosis could be involved in NIV entry. Filopodia are protrusions of the plasma membrane important not only for cell movement and tentative encounters with other cells but also in specialized cell types such as macrophages and immature dendritic cells – for uptake of fluid and the entrapment of exogenous antigen (for a review see Conner and Schmid, 2002; Klasse et al., 1998; West et al., 1989).

If NIV-G mimics EphB4, the same residues of ephrinB2 should be responsible for the interaction with both of these proteins. We have demonstrated that this is indeed the case: mutating ephrinB2 residues

in the solvent-exposed G-H loop that have been shown to be responsible for interaction with EphB4 in co-crystallization studies (Kolokoltsov et al., 2007) abrogated syncytia formation by NIV. A recent co-crystallization study of ephrinB2 and NIV-G (Bowden et al., 2008) confirms that this stretch of ephrinB2’s G-H loop is the binding site for NIV-G. Significantly, by tagging EphB4 with mRFP, we were able to show that this protein is co-endocytosed with ephrinB2 in the same manner as for NIV-G confirming the results of the Klein group (Zimmer et al., 2003). Because Klein’s group did not find any colocalization with markers of the clathrin and caveolae pathways, they speculated that the endocytic mechanism responsible for ephrinB2-EphB4 endocytosis was either phagocytosis or macropinocytosis, especially as they found that the process was dependent on the GTPase Rac1 (Zimmer et al., 2003). Taking this into consideration together with our results, we decided to test the effect of a number of inhibitors known to disrupt viral entry by macropinocytosis (Mercer and Helenius, 2008) on NIV entry. Viral entry by macropinocytosis is dependent both on a multi-branched signaling cascade and cytoskeleton dynamics (Mercer and Helenius, 2008). The results obtained with the Rac1, Cdc42 and RhoA dominant-negative mutants, wortmannin, LY294002, blebbistatin and in particular Latrunculin A and the amiloride derivative EIPA provide compelling evidence that the receptor-mediated endocytic pathway that NIV uses for entry is macropinocytosis.

Although EIPA abrogated NIV infection, 100% the effect of amiloride is no longer considered to be the definitive test for macropinocytosis (Mercer and Helenius, 2008). However, as macropinocytosis, unlike fusion at the plasma membrane, requires actin polymerization to allow the necessary changes in cytoskeleton dynamics our finding that Latrunculin A gives an 83% inhibition of NIV infection provides very strong support that macropinocytosis is involved. It is interesting to note that inhibitors such as genestein and Toxin B, which are toxic and have pluripotent effects in the cell, show relatively lower inhibition rates (22% and 50%, respectively) whereas the more specific inhibitors give higher inhibition rates. Obtaining less than 100% inhibition with macropinocytosis inhibitors could be interpreted as meaning that NIV does not enter exclusively by macropinocytosis into the cell lines we have used. We advance two major reasons why we believe that this is not the case. Firstly, as macropinocytosis is induced via a multi-branched signaling cascade (Mercer and Helenius, 2008) redundancy could provide an explanation as to why inhibition with certain drugs and dominant-negative mutants was not total. For example, Rac1 and Cdc42 dominant-negative mutants gave reductions in NIV infection by 46% and 53%, respectively. However, although Cdc42 is regarded to be responsible for filopodia formation (Garrett et al., 2000), filopodia are still present on cells which do not express Cdc42 (Czuchra et al., 2005). Secondly, the use of macropinocytosis for entry by NIV is supported by our finding that the cytoplasmic domain of ephrinB2 is required for entry, but significantly, not for viral spread (syncytia production).

Macropinocytosis is induced by a receptor tyrosine kinase (RTK)-dependent signaling cascade (Mercer and Helenius, 2008) and importantly the NIV receptor ephrinB2 has KIK activity. If NIV entry is dependent upon macropinocytosis the phosphorylation of ephrinB2 upon interaction with NIV would thus appear to be a necessity. Our results show that the interaction of NIV-G with ephrinB2 indeed induces the phosphorylation of the latter and that this involves a single tyrosine (Y304) in ephrinB2’s cytoplasmic domain. Significantly, mutation of this single tyrosine to phenylalanine abrogates NIV entry. However, in this respect it has recently been reported that ephrinB2’s cytoplasmic tail is not required for NIV entry (Thiel et al., 2008). If true, this would deal a near-fatal blow to our hypothesis of NIV entry by macropinocytosis but close examination of a western blot in this article reveals that there is a potential problem with their cytoplasmic tail-deleted ephrinB2. The western blot appears to show that the truncated ephrinB2 has a molecular weight (MW) of



around 45 kDa whereas that of the truncated ephrinB2 appears to be close to 40 kDa. However, the MW of untruncated ephrinB2 is in fact 37 kDa (Masood et al., 2009). We suggest that this size difference could well be the basis for the difference between our results and those of the Maisner group, pertaining to the role of ephrinB2's cytoplasmic tail in NIV entry.

A recent review on virus entry by macropinocytosis (Mercer and Helenius, 2008) poses the rhetorical question of whether there are different types of macropinocytosis and if so how do they differ? According to this review, viruses that enter by macropinocytosis cause cytoskeletal rearrangements to occur in the host cell (with the notable exception of dendritic cells) that lead to ruffling and blebbing at the plasma membrane. These changes in actin polymerization are induced by signaling from receptor tyrosine kinases (RTKs) which are indirectly activated by the virus binding to a plasma membrane protein. When the small filopodia or lamellipodia which constitute the ruffles melt back into the plasma membrane they engulf the virus to enclose it together with extracellular fluid in a macropinosome. We suggest that NIV entry by macropinocytosis represents a variation of this because the NIV receptor itself is an RTK and induces the formation of filopodia constitutively. Our interpretation of our results is that rather than inducing filopodia formation, the interaction with NIV-G with ephrinB2 triggers a signaling pathway that results in filopodia formation being turned off so that they retract and in doing so engulf the NIV particle (Fig. 7).

An obvious strategic advantage of macropinocytosis over plasma membrane fusion for viral entry is that – as for other endocytic

mechanisms – no trace of the virus is left at the plasma membrane to attract the attention of the host immune response. However, further study will be required to investigate whether our results obtained with Vero and CHO-K1 cells can be extrapolated to other cell types. In particular it will be interesting to determine whether NIV entry occurs in cells such as macrophages and dendritic cells which operate continuous constitutive macropinocytosis.

Interestingly, our results suggest that the endocytic mechanism of entry used by NIV does not require low pH. But then why does fusion not occur at the plasma membrane? We suggest two possible explanations for this enigma. First, that in the case of NIV, endocytosis of the virus could occur more rapidly than plasma membrane fusion. The second possible explanation that we have considered is that NIV entry and NIV spread (cell–cell fusion) require different conformations of NIV-G. We are currently investigating both of these possibilities.

It is becoming clear that the mere docking of a virus to its cellular receptor is often insufficient for entry. Viruses have evolved to make use of the cellular machinery to enter the host cell and a prime means to do this is via signalization. That virus attachment to receptors triggers essential intracellular signals has only recently been appreciated (Marsh and Helenius, 2006). Interestingly, it has been reported that phosphorylation of Y304 of ephrinB2 confers high-affinity binding to the SH2 domain of the SH2/SH3 adaptor protein Grb4 which transduces signals via its SH3 domains (Su et al., 2004). As Grb4 transduces signals to downstream effectors of cytoskeleton dynamics Rac1 and Cdc42, this provides a plausible

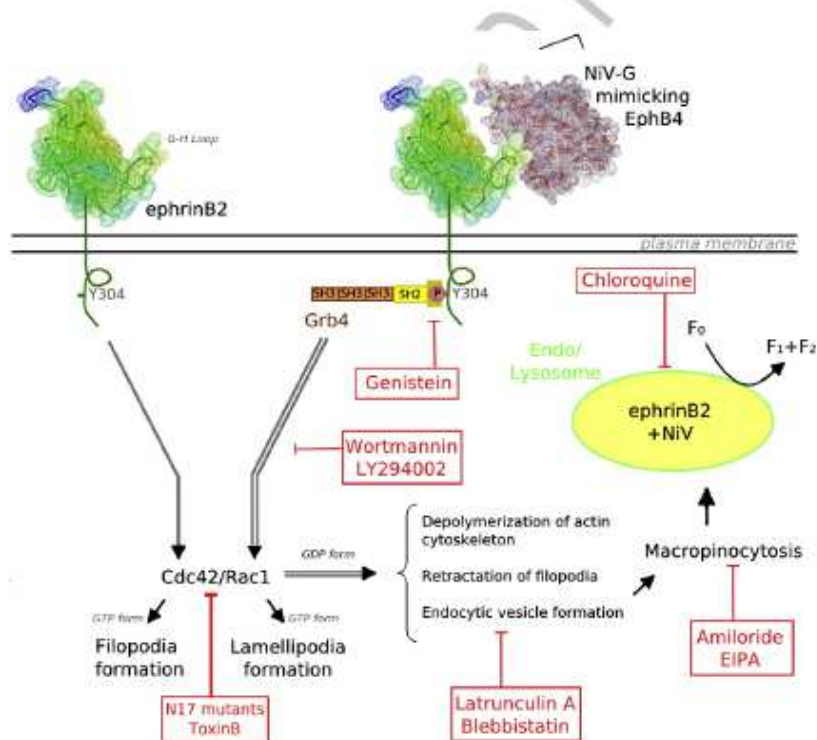


Fig. 7. The entry of NIV by receptor-mediated macropinocytosis. In this hypothetical schematic, the results presented in this study are summarized with the results of others (Bowden et al., 2008; Chrennik et al., 2006; Cowan and Henkemeyer, 2001; Marston et al., 2003; Su et al., 2004; Zimmer et al., 2003). Various inhibitors of this pathway are shown in red and their potential site of action indicated. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article as: Pernet, O., et al., Nipah virus entry can occur by macropinocytosis, Virology (2009), doi:10.1016/j.virol.2009.09.016

604 explanation of how NIV-G-induced ephrinB2 phosphorylation  
605 induces macropinocytosis. This is summarized in our schematic  
606 model for NIV entry shown in Fig. 7.

607 It is conceivable that our results can be generalized for those  
608 viruses whose receptor (i) is downregulated upon infection, (ii) is a  
609 signaling protein and (iii) induces the production of filopodia. Human  
610 adenovirus subverts CtBP1-controlled macropinocytosis to gain entry  
611 (Amstutz et al., 2008), but although the actual mechanism by which  
612 macropinocytosis is subverted was not deduced by these authors,  
613 interestingly, this adenovirus uses CD46 as a receptor. CD46 is also a  
614 receptor for MV. That MV has the capacity to enter cells by  
615 macropinocytosis has been reported (Crimeen-Irwin et al., 2003)  
616 but this process was suggested to function to remove fusion-in-  
617 competent virus. Interestingly, we have discovered that CD46 – as  
618 well as MV's other cellular receptor SLAM (CD150) – induces the  
619 formation of filopodia extremely similar to those induced by ephrinB2  
620 (Kweder and Buckland, unpublished results). CD46 is used as a  
621 receptor by other viruses such as human herpes virus 6 and certain  
622 bacteria such as *Neisseria* spp (Liszewski et al., 2005). Moreover, for  
623 *Neisseria gonorrhoeae*, cell entry has been shown to occur by macro-  
624 pinocytosis (Zenni et al., 2000) and that CD46 is phosphorylated at  
625 tyrosine residue 354 upon infection (Lee et al., 2002). Furthermore, a  
626 cellular protein to which oncolytic MV has been retargeted is EGFR  
627 (West et al., 2000). This choice was perhaps serendipitous as it  
628 appears to have been made, not because of EGFR's capacity to be  
629 macropinocytosed (following EGF binding) but for EGFR's frequent  
630 overexpression on human cancer cells.

631 In conclusion, the data we have accumulated provides convincing  
632 evidence that NIV entry occurs by macropinocytosis in the cell lines  
633 we have studied. Set against the present lack of NIV vaccines and the  
634 unlikelihood of their future development due to commercial consid-  
635 erations, the discovery that NIV can enter by this endocytic  
636 mechanism gives important new hope that a low-cost alternative  
637 antiviral strategy can potentially be developed against this deadly  
638 virus. In this regard, amiloride and CQ are particularly attractive  
639 candidates as they have both been long utilized in human medicine  
640 for treating hypertension and malaria, respectively. We are currently  
641 conducting trials in our P4 laboratory to evaluate the capacity of both  
642 of these drugs to block NIV infection in our animal model, the hamster.

## 643 Materials and methods

### 644 Cells

645 Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells (# ACC110 obtained from  
646 DSMZ) were maintained in F12 medium containing 10% fetal bovine  
647 serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml strepto-  
648 mycin, 1 U/ml Fungizone and 10 mM HEPES. VeroE6 cells (African  
649 green monkey kidney fibroblast) were maintained in Dulbecco's  
650 modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine  
651 serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml  
652 streptomycin, 1 U/ml Fungizone and 10 mM HEPES. All cell culture  
653 reagents were obtained from Invitrogen. Typically,  $5 \times 10^5$  CHO or  
654  $2.5-5 \times 10^5$  Vero cells were seeded per well of a 6-well culture plate  
655 prior to transfection or infection.

### 656 Production of mutants and fusion proteins

657 Site-directed mutagenesis was performed as previously described  
658 (Guillaume et al., 2006). The NIV-G coding sequence was amplified  
659 by PCR (FastStart; Roche) and inserted into the pCIP-NI (enhanced  
660 cyan fluorescent protein) plasmid (Clontech) between the *Bsr*GI and  
661 *Not*I restriction sites or between the *Not*I restriction sites of the  
662 *Not*I-modified pCDNA3-mRFP (monomeric red fluorescent protein)  
663 plasmid. *Not*I-modified pCDNA3-mRFP is a pCDNA3-mRFP (Addgene)  
664 plasmid with an additional *Not*I site 8 bases before the *Eco*RI

655 restriction site. The murine EphB4 (a gift from Ralf H. Adams, CRUK  
656 London) was cloned between the *Hind*III and *Bam*HI sites of pCDNA3-  
657 mRFP. The plasmids pCMV-NIV-G, pCMV-NIV-G E533Q and  
658 pCMV-NIV-F have been previously described (Guillaume et al.,  
659 2006). The human ephrinB2 DNA sequence was cloned from the  
660 commercially available expression plasmid pCMV6-XLA-hefnB2  
661 (Origene) and inserted into the pEGFP-NI (enhanced green fluorescent  
662 protein) plasmid (Clontech), between the *Bgl*II and *Sal*I sites. The  
663 human CD46 DNA sequence was cloned from plasmid pgpt.CD46  
664 (Masse et al., 2004) and inserted into pEGFP-NI (Clontech), between  
665 the *Bgl*II and *Sal*I sites. The mutated plasmids were amplified and  
666 purified as described previously (Masse et al., 2004). Mutations were  
667 introduced using QuickChange kit (Qiagen, France) according to the  
668 manufacturer's instructions. All mutations were verified by DNA  
669 sequencing. Primer sequences are available on request.

### 670 Transfections

671 Cells were transfected in 1 ml OptiMEM medium containing  
672 plasmid DNA and 1% Lipofectamine (both Invitrogen). For single and  
673 double transfections, 1 µg of each plasmid was used (unless indicated  
674 otherwise). For triple transfections, 1 µg of pCMV-NIV-G, 0.5 µg of  
675 pCMV-NIV-F and 0.25 µg of pEGFP-N1-ephrinB2 or its mutants were  
676 transfected. After 5–7 h incubation at 37 °C, the cells were washed and  
677 fresh medium added.

### 678 Infections

679 As NIV is a BSL class 4 agent, infections were performed in the Jean  
680 Mérieux BSL-4 laboratory, Lyon, France. NIV (isolate UMMC2,  
681 GenBank accession number AY029768.1) isolated from the cerebro-  
682 spinal fluid of a patient was a generous gift from Kaw Bing Chua  
683 (University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia). Virus was grown and  
684 titrated in Vero cells, and a stock was made on the seventh passage on  
685 Vero cells following virus isolation. Vero cells or transfected CHO cells  
686 were infected with 200 PFU NIV per well for 45 min at 37 °C using a  
687 virus stock diluted in 1 ml of non-supplemented DMEM. Infection  
688 media were then removed and fresh medium added. Images were  
689 taken 48 h later.

### 690 Microscopy analysis

691 Transfected cells, in D-PBS supplemented with MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub>,  
692 were observed using a Zeiss Axiovert 200M microscope. Confocal  
693 microscopy analyses were performed with either a Leica SP5 or a Zeiss  
694 Confocal Axiovert100M LSM510 microscope. Time-lapse analyses  
695 were performed using a Zeiss Time-lapse Axiovert 100M microscope  
696 at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were analyzed after the indicated time  
697 points p.t. or p.i. Microscopy data were analyzed using ImageJ  
698 freeware and Leica LAS AF lite software.

### 699 Cellular and immuno-staining

700 Cells cultivated on LabTek slides (or on coverslips) were  
701 washed with PBS supplemented with CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>. To detect  
702 NIV-G, cells were fixed with 4% PFA, permeabilized with PBS-0.2%  
703 Triton X-100 and immuno-stained using a monoclonal mouse-α-  
704 NIV-G antibody (clone 5A7, generated in our laboratory by V.  
705 Guillaume) diluted 1:250 and a secondary goat-α-mouse antibody  
706 conjugated with Alexa568 (diluted 1:500, Molecular Probes). To  
707 localize ephrinB2 on CHO-K1 cells (Fig. S3), soluble mEphB4-Fc  
708 was stained with goat anti-human antibody conjugated with  
709 Alexa 568 (diluted 1:500; Molecular Probes). For lysosome  
710 staining, cells were treated with 50 nM LysoTracker Red DND 99  
711 (Molecular Probes) for 20 min at 37 °C, washed twice before  
712 fixation with cold 4% PFA for 10 min at room temperature and

723 mounting in Faramount Mounting Medium (Dako). Alternatively,  
724 cells were first fixed, permeabilized with 0.25% PBS-Triton X-100  
725 and then stained with 1:200 diluted polyclonal murine anti-lamp1  
726 antibody (Santa Cruz, CA; a kind gift from D. Muriaux) followed by  
727 1:500 diluted goat- $\alpha$ -mouse antibody conjugated with Alexa568  
728 (Molecular Probes). Tyrosine phosphorylation was detected in  
729 PFA-fixed cells using a mouse- $\alpha$ -phosphotyrosine antibody (clone  
730 P66, Sigma) diluted 1:1000 in PBS supplemented with 1% BSA and  
731 0.33% saponin and a goat- $\alpha$ -mouse antibody conjugated with  
732 Alexa680 (diluted 1:600, Molecular Probes) in BSA-saponin buffer.  
733 Samples were mounted prior to analysis. In some experiments,  
734 mounting medium was supplemented with 0.5% DRAQ5 DNA dye  
735 (Biosstatus Limited) or Prolong antifade reagent containing DAPI  
736 (Invitrogen).

### 737 Flow cytometry

738 To determine the expression levels of ephrinB2-eGFP and its  
739 mutants as well as NIV-G and its fluorescently labeled or mutated  
740 versions, CHO-K1 or Vero cells were transfected as described above  
741 and analyzed by flow cytometry after 48, or 24 h p.t., respectively.  
742 Briefly, cells were washed with PBS, detached using trypsin and  
743 washed in 1 ml FACS buffer (0.5% bovine serum albumin and 0.02%  
744 sodium azide in D-PBS). Cells expressing NIV-G or one of its derivatives  
745 were fixed for 10 min in 4% PFA (in PBS), washed and immuno-  
746 stained using 5A7 monoclonal mouse- $\alpha$ -NIV-G antibody diluted  
747 1:200 in FACS buffer followed by a goat- $\alpha$ -mouse antibody  
748 conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC, Dako) diluted  
749 1:100 in FACS buffer for 30 min at 4 °C each. Cells were analyzed  
750 using a FACSCalibur 3C cytometer (Becton Dickinson) and CellQuest-  
751 Pro Software.

### 752 Co-culture assays

753 First, cells were separately cultivated and transfected as described.  
754 Then cells were detached with trypsin and re-seeded for co-culture at  
755 a ratio of 40:60 (ephrinB2-expressing cells:NIV-G-expressing cells) on a  
756 cover slide for 24 h. Cells were fixed, immuno-stained for NIV-G and  
757 mounted as described above for subsequent analysis by confocal  
758 microscopy.

### 759 VLP assay

760 VLPs were produced, following the protocol of Patch et al. (2007) by  
761 transfection of CHO-K1 cells with pCMV-NIV-G or pCMV-NIV-G +  
762 pCMV-NIV-F + pCMV-NIV-M for 36 h. VLP-containing cell culture  
763 supernatants were stained with 1  $\mu$ g/ml R18 for 1 h on a shaker at RT  
764 and then centrifuged (10 min, 3000  $\times$ g at 4 °C). Supernatants were  
765 diluted in up to 3 ml NTE buffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH  
766 7.5; 1 mM EDTA), loaded onto a 1-ml 20% sucrose cushion and ultra-  
767 centrifuged for 2 h at 150000  $\times$ g at 4 °C (Himac CS 150GX ultra-  
768 centrifuge with an S80AT3 rotor). Pellets were washed with NTE buffer  
769 and re-ultra-centrifuged. Pellets were finally resuspended in 200  $\mu$ l  
770 NTE buffer. VLP preparations were added to CHO-K1 cells expressing  
771 either ephrinB2-eGFP or eGFP for 1 h at 37 °C. Cells were then washed  
772 extensively, fixed, mounted and analyzed by confocal microscopy. A  
773 western blot was made to confirm the presence of NIV-G and NIV-F in  
774 the VLPs. Briefly, the purified VLPs were resuspended and reduced in  
775 Laemmli buffer containing 5%  $\beta$ -mercapto-ethanol (Sigma) at 100 °C  
776 for 10 min. Proteins were then separated on SDS-PAGE (12%  
777 acrylamide-bisacrylamide) and transferred onto a PVDF membrane.  
778 The NIV glycoproteins were stained using a murine  $\alpha$ -NIV serum  
779 (generated in our laboratory by V. Guillaume) as a primary antibody  
780 and then a rabbit anti-mouse antibody (Dako) conjugated with  
781 horseradish peroxidase (HRP) as secondary antibody. HRP was  
782 revealed using an ECL kit and CL-Exposure film (both Pierce).

### Quantification of NIV entry

784 In this study, two methods have been used to quantify the effect of  
785 various inhibitors and mutations on NIV entry and determine its basis:  
786 a cell-cell fusion assay and a plaque assay. Both methods were used in  
787 tests involving viral infection (under BSL-4 conditions), but for  
788 infections due to inherent problems of maintaining monolayer  
789 integrity, only the cell-cell fusion assay was used.

### Plaque assay

791 The  $5 \times 10^5$  Vero cells per 6-well culture plate were seeded and  
792 confluent cell layers were infected as described above. After infection,  
793 cells were kept in medium containing 33% carboxymethyl cellulose  
794 (Interchim) supplemented with inhibitors as indicated. Three days p.i.,  
795 cells were washed with D-PBS, incubated with crystal violet solution  
796 (0.2% crystal violet, 10% formol and 20% ethanol) for 15 min and  
797 subsequently rinsed with water. The number of plaques (syncytia)  
798 was counted and the percentage relative to non-treated cells (set to  
799 100%) calculated. Experiments were performed in triplicate and the  
800 error bars represent the standard deviation between experiments. A  
801 Student's *t*-test was applied to determine the statistical relevance of  
802 the results obtained with Toxin B and genistein based on the original  
803 plaque counts in three experiments.

### Quantification of cell-cell fusion

804 Cell-cell fusion in transfected cells was quantified as described  
805 previously (Guillaume et al., 2006). Briefly, 24 h p.t. or 48 h p.i.,  
806 respectively, images of three microscope fields were taken randomly  
807 and the proportion of nuclei in syncytia relative to the total number of  
808 nuclei was determined by counting. Experiments were performed in  
809 triplicates and error bars represent the standard deviation.

### Inhibition of macropinocytosis/viral entry

811 5-[N-Ethyl-N-isopropyl] amiloride (EIPA) (100 mM in DMSO),  
812 Toxin B (10 mM in non-supplemented DMEM), Wortmannin (10 mM  
813 in DMSO), LY294002 (100 mM in DMSO), Blebbistatin (100 mM  
814 in DMSO) and genistein (10 mM in ethanol) stock solutions were  
815 prepared (all Sigma). One hour before infection (or 7 h p.t. for controls  
816 with plasmids), inhibitors were added to the culture medium as well as  
817 to the infection and post-infection media (10 $\times$ , diluted for long-term  
818 lethal inhibitors Latrunculin, Wortmannin LY294002 and Blebbistatin).  
819 Quantification of the infection of non-transfected cells was measured  
820 by a plaque assay as described below whereas for cells transfected prior  
821 to infection the cell-cell fusion assay was used. Rho GTPases Cdc42,  
822 Rac1 and RhoA were inhibited by their respective N17 dominant-  
823 negative mutants: for the infection assay,  $2.5 \times 10^5$  Vero cells were  
824 transfected with 0.4  $\mu$ g of pEGP-CI-N17Cdc42 or pEGP-CI-N17Rac1  
825 (gifts from P. Jurdic) or pEGP-CI-N19RhoA (a gift from Delphine  
826 Muriaux) in 6-well culture plates and infected 18 h p.t. as described  
827 above. For the fusion assay, 0.4  $\mu$ g of pEGP-CI-N17Cdc42 or pEGP-CI-  
828 N17Rac1 or pEGP-CI-N19RhoA dominant-negative mutants was  
829 co-transfected with 1  $\mu$ g of pCMV-NIV-G and 1  $\mu$ g of pCMV-NIV-F.  
830

### Fluid phase uptake analysis

831 Fluid phase uptake was assessed using a modified protocol  
832 previously described (Mercer and Helenius, 2008). Vero cells  
833 ( $5 \times 10^4$  per well) were seeded in 24-well culture dishes and either  
834 transfected with pCMV-NIV-G the following day or left untreated. At  
835 20 h p.t., all cells were serum starved for 3 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> before  
836 adding 100  $\mu$ M EIPA in serum-reduced DMEM (containing 0.1% FCS)  
837 for 1 h. Cells not receiving any EIPA treatment were left in non-  
838 supplemented starvation medium (DMEM + 0.1% FCS). For PMA  
839

840 treatment (positive control), cells were incubated in medium  
841 containing 100  $\mu$ M PMA for 1 h at 4 °C. PMA-treated cells were  
842 washed twice with cold D-PBS and 70-kDa FITC-conjugated Dextran  
843 (Sigma) was added to all cells for 10, 30 or 60 min, respectively.  
844 During the incubation, cells were agitated regularly. Finally, cells were  
845 washed twice with cold PBS, once with low pH buffer (0.1 M sodium  
846 acetate, 0.05 M NaCl, pH 5.5), and then prepared for subsequent flow  
847 cytometric analysis as described above.

#### 848 Acknowledgments

849 This study was supported by the INSERM and the ANR 2005  
850 program "Microbiologie, infections et immunités" (contract # ANR-  
851 05-MIIM-017-02). C.P. received a post-doctoral grant from the same  
852 ANR contract; this was followed by a research fellowship from the  
853 Deutsche Forschungsgemeinschaft. O.P. has an MRT grant from the  
854 French Ministry of Research. H.K. has a grant from the Syrian  
855 Government. M.A. and R.B. have INSERM and CNRS positions,  
856 respectively. We thank Pierre Jurdic for the plasmids expressing the  
857 dominant-negative mutants N17Rac1-eGFP and N17Cdc42-eGFP,  
858 Delphine Muriaux both for the plasmid expressing the N19RhoA-  
859 eGFP dominant-negative mutant and for the anti-Lamp1 antibody,  
860 Ralf H. Adams for a murine EphB4 plasmid and Vanessa Guillaume for  
861 the  $\alpha$ -NIV-G monoclonal antibody 5A7 and a murine anti-NIV  
862 polyclonal antibody. We thank Hervé Raoul director of the INSERM  
863 Jean Mérieux P4 laboratory and the laboratory's staff, in particular  
864 Sandra Lacote, and we thank the staff of the IFRI28 PLATIM, in  
865 particular Fabienne Simian-Lerme and Claire Lionnet.

#### 866 Appendix A. Supplementary data

867 Supplementary data associated with this article can be found, in  
868 the online version, at doi:10.1016/j.virol.2009.09.016.

#### 869 References

870 Akories, K., Barbieri, J.T., 2005. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (5), 397–410.

871 Amstutz, B., Gastaldello, M., Kalin, S., Imelli, N., Boucde, K., Wandler, E., Mercer, J., Hemmi, S., Greber, U.F., 2008. Subversion of Crb1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J.* 27 (7), 956–969.

872 Bonaparte, M.I., Dimitrov, A.S., Bossart, K.N., Crameri, G., Mangili, B.A., Bishop, K.A., Choudhry, V., Dimitrov, D.S., Wang, L.F., Eaton, B.T., Broder, C.C., 2006. Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (30), 10652–10657.

873 Bowden, T.A., Aricescu, A.R., Gilbert, R.J., Gomes, J.M., Jones, E.Y., Stuart, D.I., 2008. Structural basis of Nipah and Hendra virus attachment to their cell-surface receptor ephrin-B2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (6), 567–572.

874 Cantin, C., Holguera, J., Ferreira, I., Villar, E., Muñoz-Barroso, J., 2007. Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 88 (Pt 2), 559–569.

875 Conner, S.D., Schmid, S.I., 2002. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 156 (5), 921–929.

876 Cowan, C.A., Henkemeyer, M., 2001. The SH2/SH3 adaptor Gb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* 413 (6852), 174–179.

877 Crimeen-Irwin, B., Ellis, S., Christensen, D., Ludford-Manning, M.J., Milland, J., Lanteri, M., Loveland, B.E., Gerlier, D., Russell, S.M., 2003. Ligand binding determines whether CD46 is internalized by clathrin-coated pits or macropinocytosis. *J. Biol. Chem.* 278 (47), 46927–46937.

878 Diederich, S., Thiel, L., Masher, A., 2008. Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry. *Virology* 375 (2), 391–400.

879 Earp, L.J., DeRosier, S.E., Park, H.E., and White, J.M. (2004). The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. In "In : R.W. Compans, M.D. Cooper, T. Honjo, H. Kapanowski, H. Melchers, F. Osdoby, M.B. Olines, S. Potter, M. et al. (Eds.), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285: Springer-Verlag, New-York", pp. 25–66. Springer-Verlag, New-York.

880 Foo, S.S., Turner, C.J., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., Lindblom, P., Shani, M., Zicha, D., Adams, R.H., 2006. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* 124 (1), 161–173.

881 Garrett, W.S., Chen, L.M., Krachewski, R., Ebenold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galan, J.E., Mellman, I., 2000. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102 (3), 325–334.

Guillaume, V., Aylan, H., Ainozou, M., Guerbak, M., Wild, T.F., Buckland, R., Langedijk, J.P., 2006. Evidence of a potential receptor-binding site on the Nipah virus G protein (NIV-G): identification of globular head residues with a role in fusion promotion and their localization on an NIV-G structural model. *J. Virol.* 80 (15), 7546–7554.

882 Himanen, J.P., Rajashankar, K.R., Lackmann, M., Cowan, C.A., Henkemeyer, M., Nikolov, D.B., 2001. Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 414 (6866), 912–918.

883 Holland, S.J., Gale, N.W., Mhamali, G., Vancopoulos, G.D., Henkemeyer, M., Pawson, T., 1996. Bidirectional signalling through the Eph-family receptor Nuk and its transmembrane ligand. *Nature* 383 (6602), 722–725.

884 Klasse, P.J., Boin, R., Marsh, M., 1998. Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34 (1), 65–91.

885 Koloditsky, A.A., Deniger, D., Fleming, E.H., Roberts Jr., N.J., Karpilow, J.M., Davey, R.A., 2007. Small interfering RNA profiling reveals key role of clathrin-mediated endocytosis and early endosome formation for infection by respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 81 (14), 7786–7800.

886 Kornilova, E., Sotkina, T., Begunov, I., Sorokin, A., 1996. Lysosomal targeting of epidermal growth factor receptors via kinase-dependent pathway is mediated by the receptor carboxyl-terminal residues 1022–1123. *J. Biol. Chem.* 271 (48), 30340–30346.

887 Lamb, R.A., Koloditsky, D., 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In : Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 4th ed., pp. Lippincott-Raven Press, New York, pp. 1305–1340.

888 Lee, S.W., Bonnah, R.A., Higashi, D.I., Atkinson, J.P., Magram, S.I., So, M., 2002. CD46 is phosphorylated at tyrosine 354 upon infection of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Cell Biol.* 156 (6), 951–957.

889 Liszewski, M.K., Kemper, C., Price, J.D., Atkinson, J.P., 2005. Emerging roles and new functions of CD46. *Springer Semin Immunopathol.* 27 (3), 345–358.

890 Lu, Q., Sun, E.F., Klein, R.S., Fanagan, J.G., 2001. Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemotaxis. *Cell* 105 (1), 69–79.

891 Mash, M., Helenius, A., 2006. Virus entry: open sesame. *Cell* 124 (4), 729–740.

892 Maste, N., Ainozou, M., Neel, B., Wild, T.F., Buckland, R., Langedijk, J.P., 2004. Measles virus (MV) hemagglutinin: evidence that attachment sites for MV receptors SLAM and CD46 overlap on the globular head. *J. Virol.* 78 (17), 9051–9063.

893 Mercer, J., Helenius, A., 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320 (5875), 531–535.

894 Meyer, S., Hahner, C., Gubik, M., Hegel, S., Geissler, E.K., Becker, R., Koehl, G.E., Orso, E., Landthaler, M., Vogt, T., 2005. Ephrin-B2 overexpression enhances integrin-mediated ECM attachment and migration of B16 melanoma cells. *Int. J. Oncol.* 27 (5), 1197–1206.

895 Naniche, D., Wild, T.F., Saboutin-Combe, C., Gerlier, D., 1993. Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 6), 1073–1079.

896 Negrete, O.A., Levinsky, E.L., Aguilar, H.C., Bertolotti-Ciarlet, A., Nazarian, R., Tajyar, S., Lee, B., 2005. EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* 436 (7049), 401–405.

897 Negrete, O.A., Wolf, M.C., Aguilar, H.C., Ertelstein, S., Wang, W., Muhlberger, E., Su, S.V., Bertolotti-Ciarlet, A., Riek, R., Lee, B., 2006. Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. *PLoS Pathog.* 2(2), e7.

898 Pager, C.T., Dutch, R.E., 2005. Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein. *J. Virol.* 79 (20), 12714–12720.

899 Patch, J.R., Crameri, G., Wang, L.F., Eaton, B.T., Broder, C.C., 2007. Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein. *Virology* 359 (1), 1–11.

900 Sawatsky, B., Grölla, A., Kuzenkov, N., Weingartl, H., Czub, M., 2007. Inhibition of henipavirus infection by Nipah virus attachment glycoprotein occurs without cell-surface downregulation of ephrin-B2 or ephrin-B3. *J. Gen. Virol.* 88 (Pt 2), 923–931.

901 Schwalber, R.M., Wurth, M.A., Aguilar, H.C., Lee, B., Moncan, C.I., McCann, R.O., Dutch, R.E., 2006. Rho GTPase activity modulates paramyxovirus fusion protein-mediated cell-cell fusion. *Virology* 350 (2), 323–334.

902 Su, Z., Xu, P., Ni, F., 2004. Single phosphorylation of Tyr304 in the cytoplasmic tail of ephrin B2 confers high-affinity and bifunctional binding to both the SH2 domain of Grb4 and the PDZ domain of the PDZ-RGS3 protein. *Eur. J. Biochem.* 271 (9), 1725–1736.

903 Tanaka, K., Minagawa, H., Xie, M.F., Yanagi, Y., 2002. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Arch. Virol.* 147 (1), 195–203.

904 West, M.A., Bretscher, M.S., Watts, C., 1989. Distinct endocytic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J. Cell Biol.* 109 (6 Pt 1), 2731–2739.

905 West, M.A., Prescott, A.R., Biskimen, E.L., Ridley, A.J., Watts, C., 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its down-regulation. *Curr. Biol.* 10 (14), 839–848.

906 Wilkinson, D.G., 2003. How attraction turns to repulsion. *Nat. Cell Biol.* 5 (10), 851–853.

907 Zenni, M.K., Giattina, P.C., Harvey, H.A., Shao, J., Ketterer, M.R., Lubaroff, D.M., Williams, R.D., Apicella, M.A., 2000. Macropinocytosis as a mechanism of entry into primary human urethral epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* 68 (3), 1696–1699.

908 Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J., Klein, R., 2003. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat. Cell Biol.* 5 (10), 869–878.



## **ANNEXE 2**

**(Materiels et Methodes Supplementaire)**

## Visualisation de l'entrée du virus Nipah par macropinocytose

### *VLPs de NiV*

Bien que la protéine de matrice M soit très importante pour la production de virus ou de VLPs, il est possible de s'en passer. Cela n'est qu'au prix d'un rendement très inférieur (Patch2007) mais on peut ainsi produire des VLPs ne comportant qu'une seule glycoprotéine virale. En effet, pour étudier les interactions entre la glycoprotéine G et l'éphrineB2, il est préférable de se passer dans un premier temps de la glycoprotéine F.

Pour ce faire, je me suis basé sur des protocoles récents de préparation de particules virales Nipah (Patch2007) et de rougeole (Pohl2007). La préparation est assez simple : les cellules co-transfectées par les plasmides codant les glycoprotéines F et/ou G vont produire ces VLPs, mais en très faible quantité. Il suffit ensuite de prélever les surnageants et de les purifier, au besoin, selon le protocole décrit dans le chapitre suivant.

Comme décrit par (Patch2007) la production de VLPs est décuplée par l'expression de la protéine de matrice M. Ainsi, il suffit de co-transfecter les plasmides de glycoprotéines avec celui de protéine M pour améliorer le rendement.

### *Coloration des virus et analyse en Time-Lapse*

#### ***Observation des particules virales par fluorescence.***

Pour pouvoir observer l'entrée, et plus généralement les mouvements des particules virales de Nipah, il a fallu mettre en place un protocole nouveau et compatible avec le matériel disponible dans le laboratoire P4. Les virus ne devant pas sortir du P4, et n'ayant pas accès à un microscope électronique à l'intérieur, il a fallu trouver une autre méthode. J'ai donc construit ce protocole pour que les virus soient visibles par fluorescence. Le plus simple

était de marquer la membrane. Un colorant lipophile, le R18 permet un marquage des membranes sans perturber l'action des glycoprotéines de surface. De plus, sa forte intensité de fluorescence permet de détecter de très petites particules, par exemple des virus enveloppés.

Après plusieurs essais basés sur ce principe, j'ai obtenu un marquage permettant de suivre les virus et/ou les particules virales enveloppé jusqu'à leur entrée dans la cellule. Voici le protocole permettant d'obtenir les résultats les plus concluants.

### ***J1 : Préparation de cellules Vero et CHO.***

- Pour les Vero, préparer 1xT25 par virus testé + 1xT25 de contrôle négatif
- Pour les CHO, 1 puits de P6 par récepteur cellulaire testé.

### ***J2 : Préparation des virus***

- les Vero (90% confluence) sont infectées (avec une m.o.i. de 0,01 dans le cas de Nipah) au P4 laissées à 37°C dans 6 mL de DMEM 10% FCS. Le contrôle négatif peut être infecté par un autre virus ayant un récepteur non exprimé sur les CHO transfectées, mais pas un virus irradié. Le plus simple est « d'infecter » les cellules contrôle avec du DMEM.
- les CHO sont transfectées avec un vecteur d'expression du récepteur viral couplé à un marqueur eGFP et laissées sur la nuit à 37°C

### ***J3 : Préparation des cellules***

- Matin : Le milieu de transfection des cellules CHO est remplacé par du milieu F12 10% FCS, éventuellement supplémenté avec du G418 si le vecteur transfecté confère une résistance au G418.



- Soir : Les cellules CHO sont détachées avec de la trypsine ou (mieux) du PBS-EDTA et re-ensemencées dans des puits de LabTek (confluence 30% environ)

#### ***J4 : Coloration et observations***

- Matin : (*Rentrer les CHO au P4, les garder à 37°C*) Les surnageants de Vero sont récupérés et centrifugés 10 minutes à 5000g pour précipiter les débris cellulaires. Les surnageants sont ensuite colorés 30 minutes à température ambiante avec 1µL de solution commerciale de R18 (10mg/mL, Molecular Probes).
- Midi : Les surnageants colorés en rouge sont déposés sur un coussin de sucrose (20% de sucrose dans du tampon NTE) dans un tube adapté au rotor pour ultra centrifugation SW41. Les virus sont ensuite ultra-centrifugés 27 500 tpm pendant 2 heures 30
- Après midi : les virus rouges sont collés au fond des tubes d'ultra-centrifugation (culot visible à l'oeil nu pour Nipah). Ces virus sont resuspendus dans du milieu sans rouge phénol adapté aux CHO (F12 Phenol Red -, OptiMEM, ...). Le milieu des CHO est remplacé par ce même milieu sans rouge phénol). Une fois bien resuspendus les virus sont déposés sur les cellules CHO pendant 15 minutes (incuber de préférence les CHO à 4°C / 5% CO<sub>2</sub>, bac de glace dans l'étuve par exemple). Laver les CHO avec du PBS et remettre du milieu sans rouge phénol. Observer en Time Lapse.



**Mise en évidence de l'entrée cellulaire du virus Nipah par macropinocytose :  
bases moléculaires et inhibition**

*Olivier Pernet*

Résumé

Les virus Nipah et Hendra sont deux Paramyxovirus émergents zoonotique apparus ces 15 dernières années en Asie du Sud-Est et en Australie. Ils sont responsables chez l'homme d'encéphalites dont le taux de mortalité peut dépasser les 90%. Il n'existe ni traitements, ni vaccins commercialisés. Ces virus sont donc classés P4. En étudiant la régulation négative de leur récepteur éphrineB2, j'ai pu mettre en évidence un mécanisme d'entrée endocytaire pour le virus Nipah : la macropinocytose. Les Henipavirus sont les seuls Paramyxovirus connus dont on a pu démontrer un tel mode d'entrée. En mimant le ligand naturel d'éphrineB2 (EphB4), les glycoprotéines virales G provoquent la rétractation des filopodes qui forment autour du virus des macropinosomes. De plus, l'entrée de ces virus peut-être bloquée *in vitro* par des inhibiteurs de macropinocytose. Certains de ces inhibiteurs sont déjà utilisés en médecine humaine, ce qui ouvre la voie à un traitement peu onéreux contre ces dangereux pathogènes.

*Nipah virus ; Hendra virus ; Macropinocytose ; Entrée virale ; Chauves-souris ; éphrineB2 ; antiviraux*

**Demonstration that Nipah virus entry occurs by macropinocytosis :  
molecular basis and inhibition**

*Olivier Pernet*

Abstract

Nipah and Hendra are two zoonotic Paramyxoviruses that have emerged over the last 15 years in South-Eastern Asia and Australia. They are responsible for encephalitis in man with a mortality rate that can exceed 90%. As there are no treatments nor vaccines available these viruses are classified P4 pathogens. By studying the receptor ephrinB2's downregulation, I discovered that Nipah virus uses an endocytic mechanism for entry : the macropinocytosis. The Henipavirus are the only known Paramyxoviruses that use such an entry mechanism. By mimicking the ephrinB2's ligand (EphB4), the viral glycoprotein G causes the retraction of filopodia to engulf the virus and form macropinosomes. I have demonstrated that the entry of these viruses can be blocked *in vitro* by the use of drugs that inhibit macropinocytosis. As some of these inhibitors are already used in human medicine, this could pave the way for a low-cost treatment of these dangerous pathogens to be developed.

*Nipah virus ; Hendra virus ; Macropinocytosis ; virus entry ; Bats ephrinB2 ; antivirals*