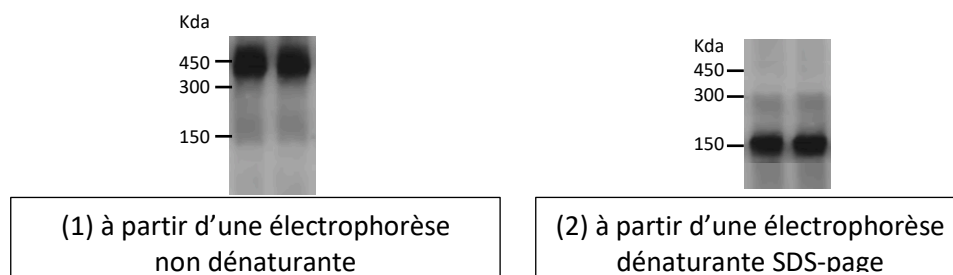


Interaction de la protéine Spike du virus Sars-Cov2 et de molécules humaines

1- Les protéines virales totales sont extraites de particules virales libres et traitées par western-blot :

- le mélange protéique est séparé par électrophorèse, dénaturante ou non dénaturante ;
- le résultat de l'électrophorèse est transféré sur membrane puis incubé avec un anticorps radioactif dirigé contre la protéine Spike ;
- l'ensemble est révélé par autoradiographie.



2- La **protéine membranaire ACE2**, récepteur membranaire localisé dans la membrane plasmique de cellules de nombreux tissus humains, est une protéine candidate à l'interaction avec la protéine virale Spike pour permettre l'infection cellulaire.

Pour tester cette hypothèse, des cellules humaines HeLa, exprimant ou non la protéine ACE2, sont cultivées en présence du SARS-CoV-2.

- HeLa-hACE2 : cellules humaines HeLa exprimant la protéine ACE2.
- HeLa : cellules humaines HeLa n'exprimant pas la protéine ACE2

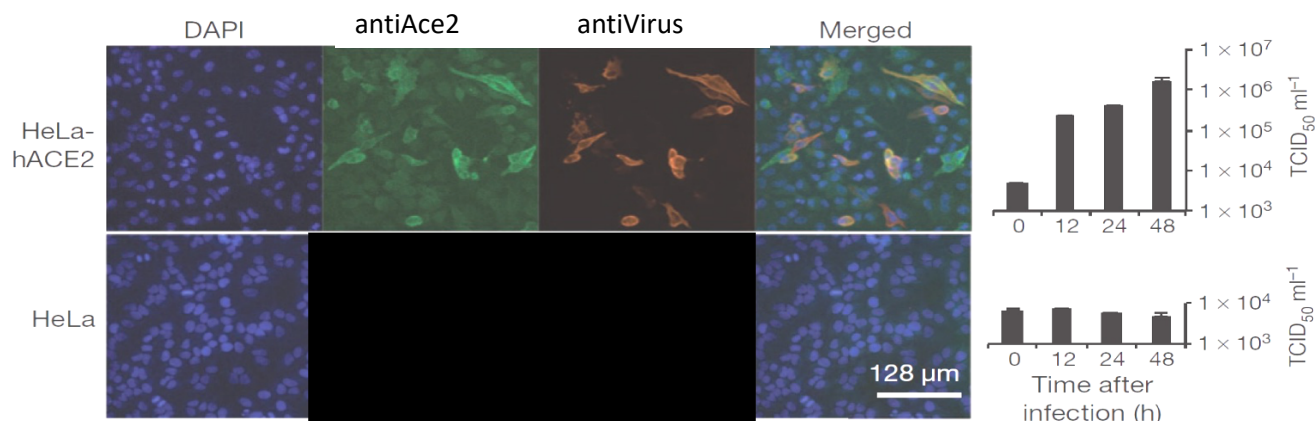
Au temps 0, le SARS-CoV-2 est rajouté aux cultures cellulaires ; 24h après l'infection, les cellules en culture sont incubées simultanément avec 3 marqueurs fluorescents spécifiques :

- DAPI : le DAPI est un marqueur fluorescent bleu de l'ADN.
- AntiACE2 : ajout d'un anticorps anti-ACE2 couplé à un marqueur fluorescent vert
- AntiVirus : ajout d'un anticorps anti-protéines virales couplé à un marqueur rouge.

Les anticorps, contrairement au DAPI, ne peuvent pas traverser la membrane plasmique.

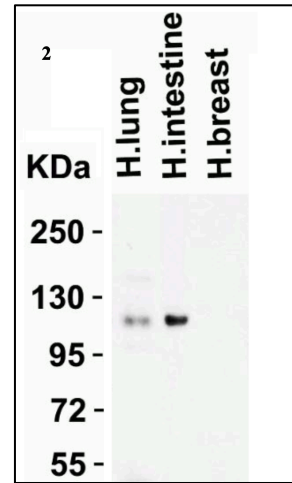
- La colonne de droite (Merged) présente les 3 images colorées superposées.

A droite, un graphique représente le TCID₅₀ au cours du temps après l'infection ; le TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50) est une mesure de la quantité de particules virales dans les cellules.



3- On réalise un western-blot selon le protocole suivant :

- extraction des protéines de 3 types cellulaires humains
- électrophorèse des 3 lots de protéines en conditions dénaturantes
- transfert sur membrane et incubation avec un anticorps radioactif dirigé contre la protéine Ace2
- autoradiographie

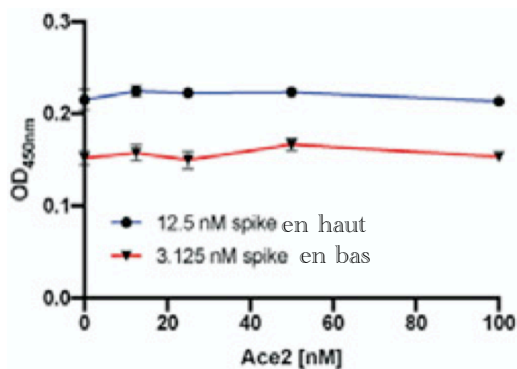
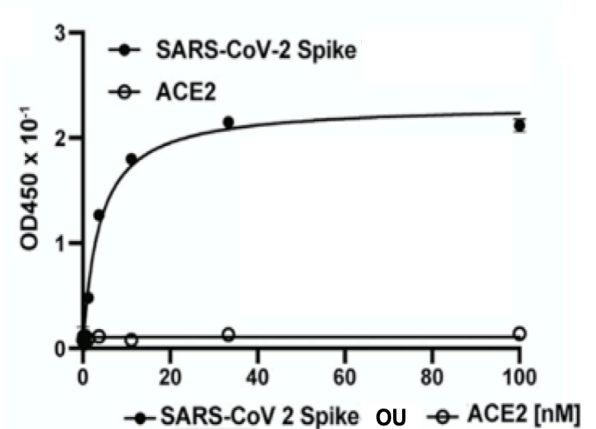


4- On teste à présent le rôle dans l'infection d'un glucide présent en périphérie de toutes les cellules animale : l'héparane sulfate.

Des plaques de verre sur lesquelles sont fixés des polymères d'héparane sulfate sont incubées avec des concentrations variables de la protéine Spike ou de la protéine ACE2 (concentrations indiquées en abscisse) puis sont lavées :

- protéine Spike : ronds noirs (SARS-CoV-2 Spike)
- protéine ACE2 : ronds vides

Les protéines ACE2 et Spike sont toutes les deux associées à un marqueur coloré : la coloration de la plaque est suivie en mesurant la densité optique à 450nm (= OD450). On rappelle que l'unité nM signifie nanomoles/litre.



5-On étudie la fixation de la protéine Spike sur les mêmes plaques que précédemment avec deux concentrations de protéine Spike (12,5 et 3,125 nM). La fixation est réalisée dans les deux cas en présence de protéine ACE2 en concentration variable (concentration en abscisses). La fixation de Spike est suivie par mesure de la densité optique.