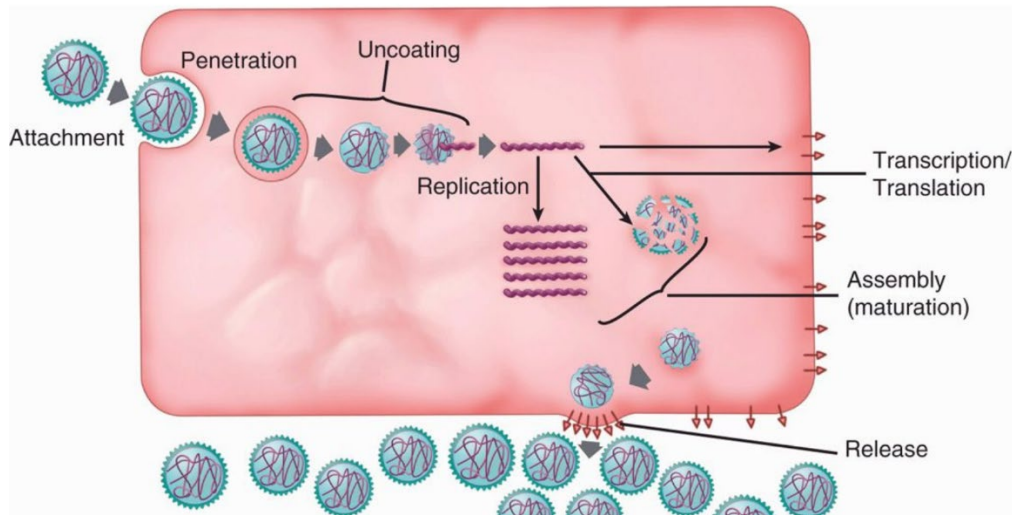


Etapes initiales de la multiplication virale (2024)

Introduction

Tous les virus sont des parasites obligatoires qui ont besoin d'une cellule pour se multiplier. Ce cycle de multiplication peut être divisé en différentes étapes. Le virus doit tout d'abord se fixer sur la cellule, avant d'y pénétrer. Il subit une décapsidation qui permet de libérer son génome. Celui-ci est ensuite répliqué pour former de nouveaux génomes. Des transcrits spécifiques de son génome ont également fabriqués. Cela permet la synthèse des protéines virales. L'assemblage des génomes et protéines virales avec parfois des composants cellulaires aboutit à de nouvelles particules virales qui sont libérées de la cellule. En fonction des espèces de virus, ces étapes ne présentent pas les mêmes spécificités.



Les étapes initiales correspondent à la fixation, la pénétration et la décapsidation.

Pour qu'un virus puisse pénétrer dans une cellule, il faut d'abord qu'il la reconnaisse puis qu'il s'y attache spécifiquement avant de pénétrer dans le cytoplasme.

Fixation du virus

La fixation du virus à la surface de la cellule est une étape absolument nécessaire à l'infection, ce qui signifie que si l'on arrive à l'inhiber, on va bloquer l'ensemble de l'infection. Pour se fixer, un virus va faire interagir ses glycoprotéines ou ses protéines de surface avec des récepteurs cellulaires. Ces protéines virales sont appelées « ligands » ou anti-récepteurs.

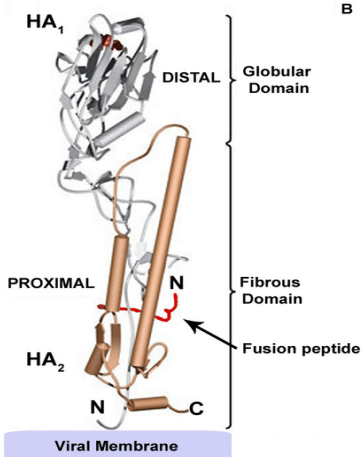
L'intégrité du ligand est essentielle pour l'attachement du virus. En effet, lorsqu'il y aura des mutations dans le gène codant pour le ligand viral, si ces mutations changent la séquence de la protéine et l'empêchent de reconnaître le récepteur cellulaire, elles rendront le virus incapable de se multiplier. Ces mutations seront désavantageuses pour le virus et ne seront donc pas sélectionnées au cours de l'évolution. Les anticorps (Ac) qui reconnaissent les ligands viraux et qui empêchent la fixation des ligands aux récepteurs à la surface des cellules sont des anticorps neutralisants. Ils empêchent le virus de se fixer, d'entrer dans la cellule et donc la propagation de l'infection. Ce sont ces anticorps qui nous protègent des maladies, on les fabrique suite, par exemple, à une vaccination. Des mutations correspondant aux sites antigéniques reconnus par les anticorps seront avantageuses pour le virus (si elles ne diminuent pas la fixation sur le récepteur)

Pour schématiser les ligands viraux sont des glycoprotéines d'enveloppe pour les virus enveloppés et des protéines de la capsid pour les virus nus.

Ligands de virus enveloppés

On va voir quelques exemples de ligands de virus enveloppés.

Par exemple, le **virus de la grippe** où la fixation se fait par l'hémagglutinine ou HA.



Voici le monomère de l'HA dans lequel on distingue deux chaînes polypeptidiques, HA1 et HA2. Voyez que l'HA s'organise en une tige à proximité de l'enveloppe virale (*fibrous domain*) et une partie globulaire (*globular domain*) qui va se fixer à la cellule.

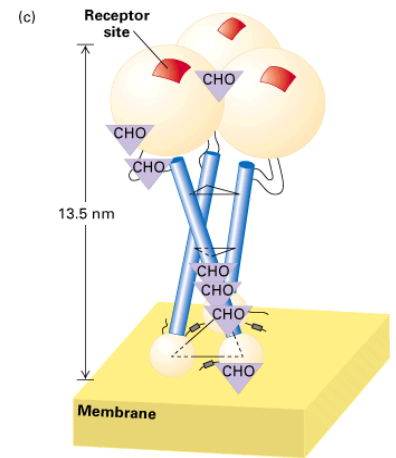
HA1. Cette protéine fait 328 acides aminés et est composée de feuillets β . L'extrémité **N-terminale** de HA1 se trouve à la base de la tige qui forme une structure étirée à proximité de l'enveloppe virale. Puis, elle se projette vers l'extérieur en prenant une forme globulaire composée de feuillets beta et puis elle revient le long de la tige.

HA2. La sous-unité HA2 est constituée de 221 acides aminés. Sa caractéristique dominante est la présence d'une épingle à cheveux formée de **deux hélices alpha** tassées l'une contre l'autre et disposées de façon antiparallèle. L'extrémité N-terminale de la chaîne **HA2** se présente sous la forme d'une **hélice**

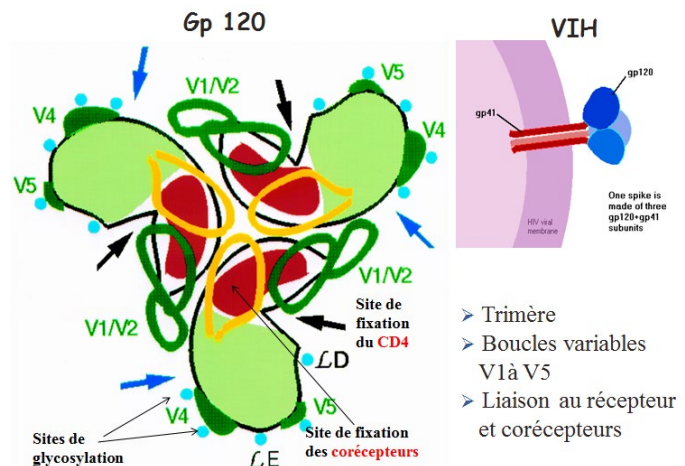
alpha, assez hydrophobe, et correspond au **peptide de fusion**. HA1 et HA2 sont liés de manière covalente par un unique pont disulfure

Le spicule d'HA du virus de la grippe s'organise en trimère. Voici le trimère de l'HA. HA2 est ancrée dans la membrane virale. Le site pour le récepteur cellulaire se trouve en haut (carré rouge), dans la partie globulaire HA1, sous forme d'une petite poche dont la structure est complémentaire de l'acide sialique.

Cette région est très conservée dans les différentes souches de virus grippal. Les acides aminés qui bordent la poche sont bien définis. En particulier, il y a un aa, la leucine 226, qui est à l'entrée de la poche et il est donc très important. S'il y a une mutation à ce niveau, le virus ne peut plus reconnaître l'acide sialique. On voit donc qu'il y a une spécificité étroite de l'acide sialique. L'acide sialique est un résidu sucré qui est retrouvé fréquemment sur les glycoprotéines de surface cellulaire. Ceci a pour conséquence que le virus peut infecter une grande variété de cellules.



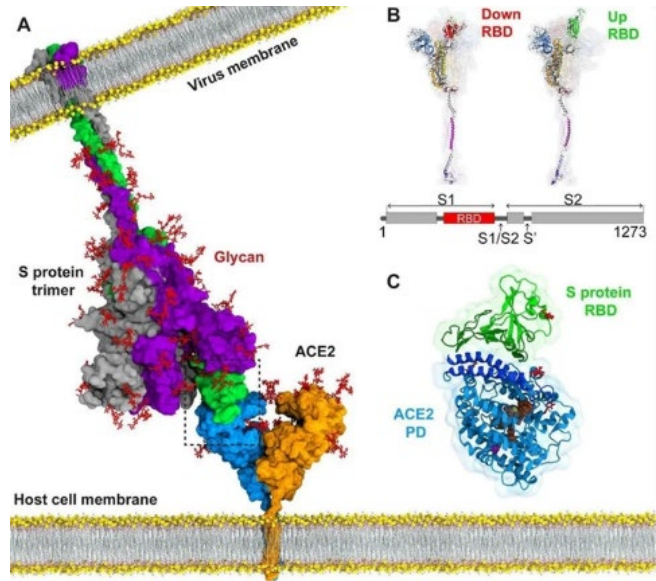
Dans le **cas du VIH**, (dont le récepteur cellulaire est le CD4) il y a deux glycoprotéines d'enveloppe la gp41 et la gp120. Le spicule à la surface de l'enveloppe est constitué d'un trimère de gp41 transmembranaire associé à un trimère de gp120 globulaire. C'est la gp120 qui se fixe sur la molécule de CD4 avec une très forte affinité. Les trois flèches noires montrent les sites de fixation du CD4. C'est encore la gp120 qui se lie aux corécepteurs mais sur une autre région, initialement cachée (en rouge dans l'illustration). C'est la liaison au CD4 qui va entraîner un changement de conformation de la gp120. gp120 et gp41 sont liées par des ponts disulfure.



- > Trimère
- > Boucles variables V1 à V5
- > Liaison au récepteur et corécepteurs

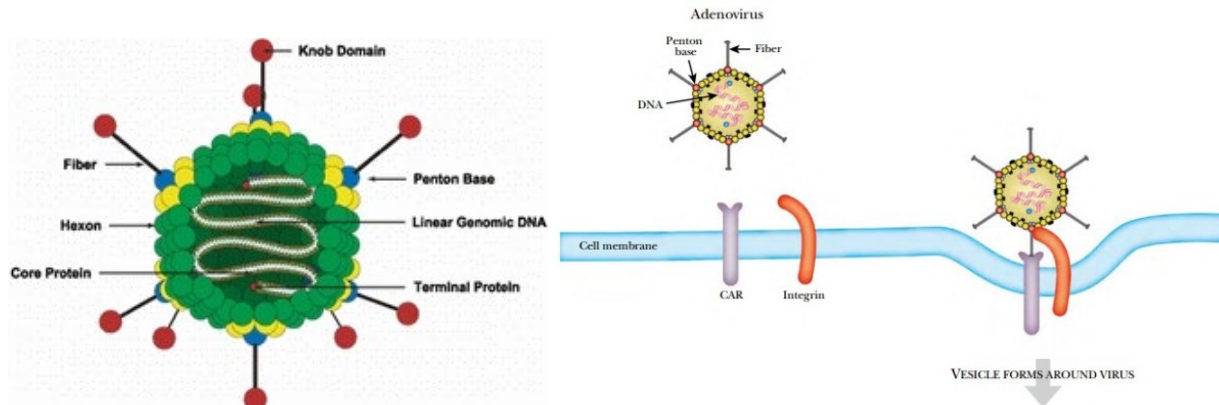
Dans le cas du **coronavirus SARS-CoV-2**, il y a plusieurs protéines dans l'enveloppe mais la fixation se fait par la glycoprotéine Spike (ou S). La protéine Spike sous forme de trimère se fixe sur ACE2 qui est présente à la surface des cellules. Cette fixation permet l'endocytose du virus. Le trimère existe sous plusieurs conformations.

La protéine S est constituée de deux parties, une partie globulaire qui correspond à S1 et une partie tige qui correspond à la partie S2. Dans S1, il y a le RBD (pour receptor binding domain), C'est la région qui reconnaît et se lie à ACE2. Les variants ont toujours des mutations dans le RBD.

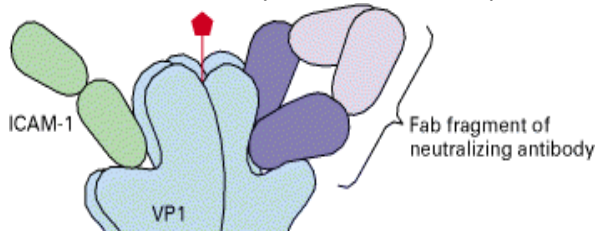


Ligands de virus non enveloppés

Les ligands des virus non enveloppés sont plus difficiles à étudier. En général pour des virus icosaédriques, ils sont au sommet de l'icosaèdre et peuvent correspondre à des ornements ou à des structures particulières. Dans le cas de l'adénovirus, la fixation à la cellule se fait par l'extrémité de la fibre qui est connectée au penton. Le bouton terminal possède un site de fixation au récepteur cellulaire CAR (pour *Coxsackie Adeno receptor*)



Dans le cas des *Picornaviridae*, ce ne sont plus les fibres qui interviennent mais une structure particulière au niveau de la capside. Il s'agit d'un canyon. Ce canyon est en quelque sorte similaire à la poche de fixation de l'acide sialique au niveau de l'HA du virus grippal. C'est un canyon de 25 Å de profondeur, qui correspond à 5 sous unités d'une protéine VP1 de la capside dans lequel s'insère le récepteur cellulaire. L'existence de ce canyon a été montrée pour le virus de la poliomyélite et pour les rhinovirus.

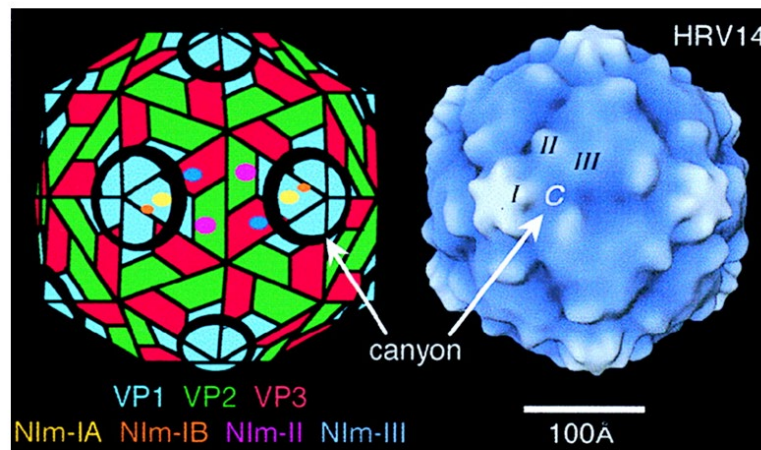


Le récepteur des Rhinovirus est une molécule d'adhésion appelée ICAM1 et le récepteur du virus de la poliomyélite s'appelle le récepteur du virus de la poliomyélite ou PVR pour PolioVirus Receptor... C'est un avantage pour un virus que le site de fixation soit dans une sorte de cavité car cela limitera l'accessibilité des sites aux anticorps qui sont de

grandes molécules encombrantes.

L'illustration ci-dessous montre une représentation schématique et une reconstruction 3D de la capside du rhinovirus humain HRV14. On voit que le canyon (sillon en noir) est organisé autour des pentons faits de VP1.

Schematic diagram (left) and cryoreconstruction (right in radially depth-cued representation) of HRV14.



T. S. Baker et al. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999;63:862-922

Microbiology and Molecular Biology Reviews

Journals.ASM.org | Copyright © American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Récepteurs cellulaires

Les récepteurs cellulaires sont très variés. Ils sont loin d'être tous connus puisqu'environ 100 récepteurs différents ont été identifiés pour plusieurs milliers de virus connus.

Ce sont des constituants normaux de la membrane cellulaire. Ce sont le plus souvent des glycoprotéines mais cela peut être aussi des protéines des résidus glycosylés ou des glycolipides. Ce sont des molécules normales qui sont nécessaires à la vie de la cellule et que le virus utilise à son profit pour se fixer.

Ces récepteurs cellulaires ont des fonctions variées pour la cellule. Souvent ces fonctions sont connues. Ce sont des molécules d'adhésion (ICAM1) des récepteurs hormonaux, des enzymes...

Il existe un nombre variable de récepteurs à la surface cellulaire, entre 500 et 500 000 récepteurs par cellule. Ceci a une influence sur l'efficacité de l'attachement.

Ces récepteurs sont répartis de manière homogène à la surface de la cellule ou localisée (comme par exemple au niveau des radeaux lipidiques).

La présence de ces récepteurs est très importante puisqu'elle conditionne l'attachement du virus et donc la sensibilité de la cellule au virus.

Certains virus utilisent des récepteurs qui sont exprimés sur un nombre limité de types cellulaires. Par exemple le VIH qui reconnaît la molécule CD4 sur les lymphocytes T et les macrophages, ou le virus Epstein-Barr (EBV) qui se fixe sur CD21 exprimé par les lymphocytes B.

D'autres virus se lient à des récepteurs qui sont largement distribués sur plusieurs types cellulaires (ex grippe et acide sialique) ou PGHS et le virus de l'Herpès.

Des virus différents peuvent utiliser le même récepteur mais un même virus peut utiliser différents récepteurs.

Stratégie d'utilisation des récepteurs

Des virus différents peuvent utiliser le même récepteur

Par exemple la molécule CD4 peut tout à la fois fixer le VIH et l'Herpesvirus Humain 7 (HHV7).

De manière quasi identique, la molécule CD46 est à la fois récepteur du virus de la rougeole et du virus HHV6. On a parlé juste avant du CAR pour les adénovirus et les virus Coxsackie.

A l'inverse, un même virus peut utiliser différents récepteurs.

Par exemple, la majorité des rhinovirus utilisent comme récepteur ICAM -1 mais une minorité utilise le récepteur aux LDL. Le virus de la rougeole utilise comme récepteur le CD46 (souche vaccinale atténuée) mais aussi SLAM (qu'on appelle encore CD150).

Certains virus utilisent plusieurs récepteurs de manière coordonnée. C'est le cas du VIH qui se fixe dans un premier temps au CD4 puis à l'un des deux corécepteurs CXCR4 ou CCR5.

Spécificité d'espèce

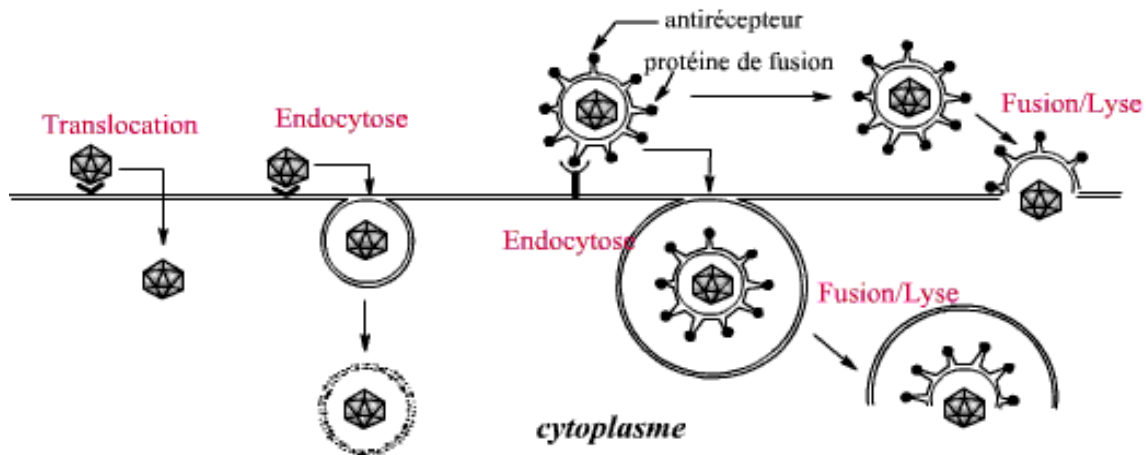
Un virus en général n'infecte pas toutes les espèces animales. Il y a les espèces sensibles, qui expriment le récepteur et celles qui ne le sont pas car elles n'expriment pas le récepteur.

Exemple : le virus de la poliomyélite ne peut infecter que les cellules de primates car seules les cellules de primates expriment le PVR.

Plusieurs récepteurs et co-récepteurs peuvent intervenir dans la fixation d'un virus. En général, le récepteur sert à la fixation de la particule virale à proprement dit et le co-récepteur participe à l'internalisation dans la cellule.

Pénétration du virus

C'est la cellule vivante qui fait pénétrer le virus. Cette phase survient juste après la phase d'adsorption et fait intervenir des mécanismes différents selon les virus.



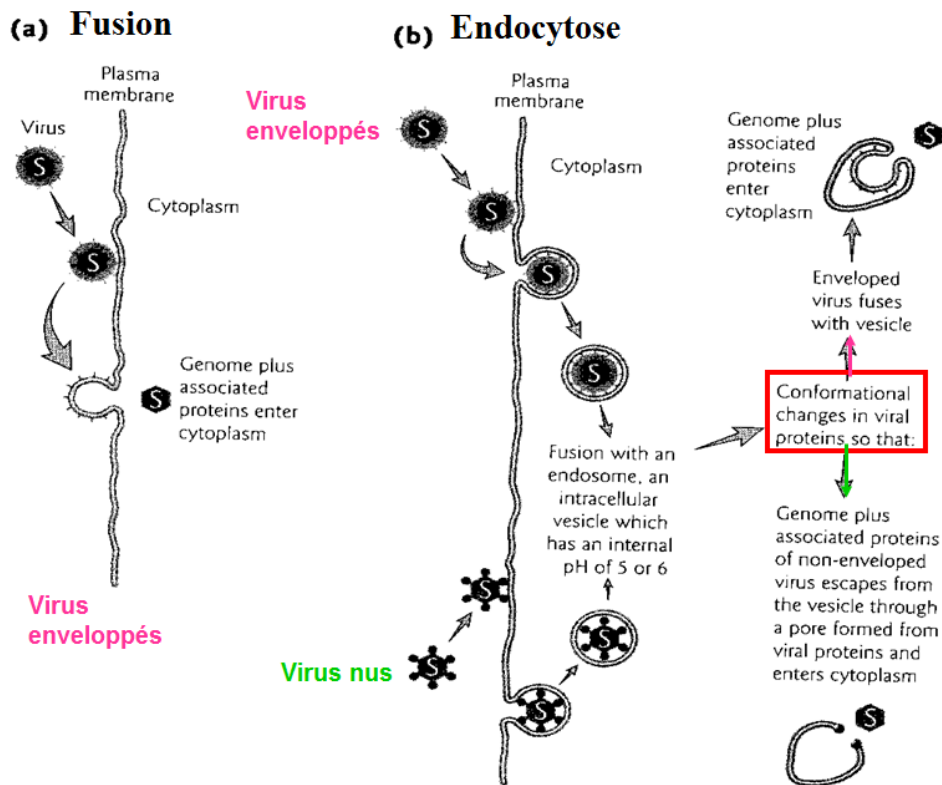
Endocytose : Beaucoup de virus enveloppés et non enveloppés utilisent les différentes voies d'adsorption des macromolécules par la cellule (endocytose clathrine dépendante, cavéoline dépendante, macropinocytose...). Les virus nus utilisent essentiellement cette voie d'endocytose.

L'endocytose correspond à une invagination de la membrane plasmique qui permet de former des vacuoles d'endocytose. Les virus se retrouvent alors dans ces vésicules cytoplasmiques. La libération dans le cytoplasme peut être pH dépendante. Comme par exemple pour le virus de la Grippe

La **Fusion** ne concerne que les virus enveloppés car la composition de l'enveloppe est proche de celle de la membrane plasmique. Elle permet la libération de la capsid dans le cytoplasme. La fusion est pH indépendant. Ex : virus de l'Herpes ou VIH

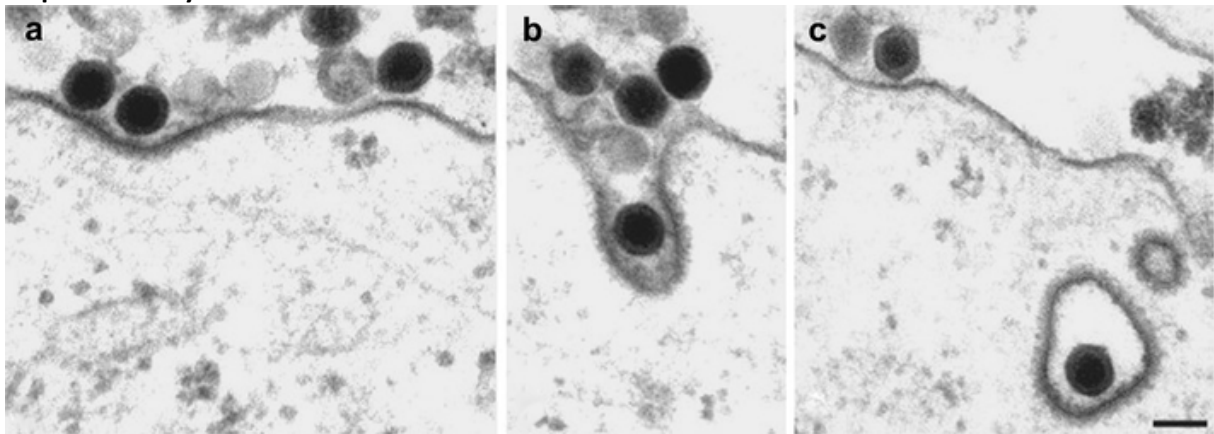
La translocation est rarement observée, elle concerne les *Picornaviridae* comme par exemple le virus de la poliomyélite.

Différents modes d'entrée des virus



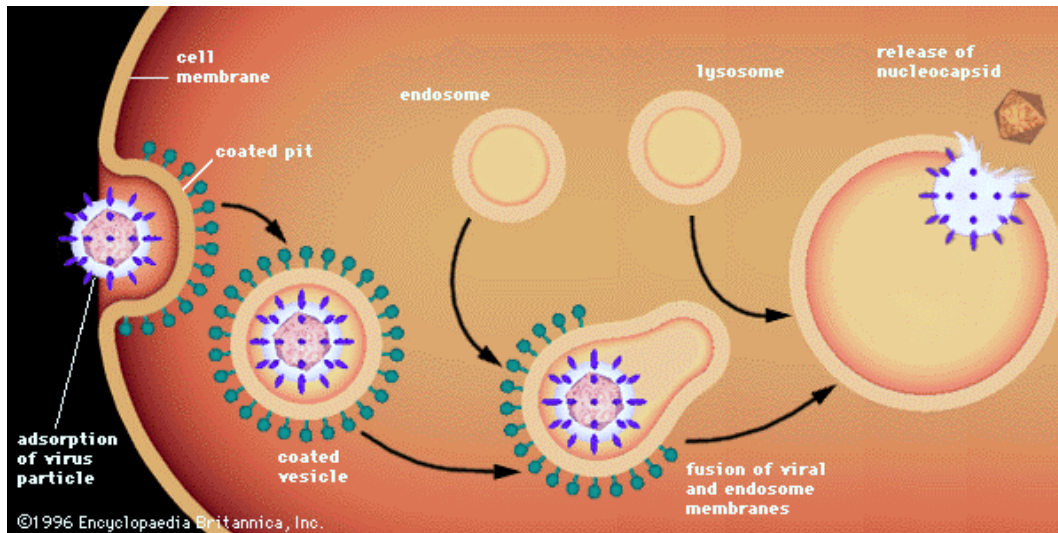
Cette illustration résume les différents modes d'entrée des virus
Virus enveloppés : fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome
 Sortie de la nucléocapside dans le cytoplasme
Virus nus : décapsidation et sortie de l'ensemble dans le cytoplasme

Exemple d'endocytose



Meier et al, 2012

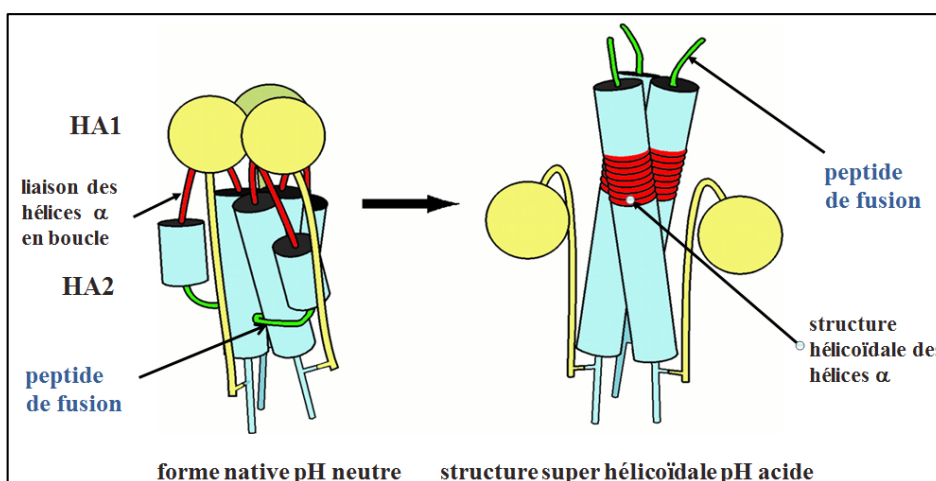
Il s'agit ici de plusieurs clichés pris en microscopie électronique montrant l'entrée d'un virus enveloppé par endocytose. Il s'agit d'un virus nu, un Adénovirus, pénétrant dans des cellules épithéliales humaines HeLa. Les virus utilisent l'endocytose clathrine dépendante et déclenchent l'invagination de la membrane plasmique. Il y aura ensuite un changement de conformation des virus dans la vésicule d'endocytose.

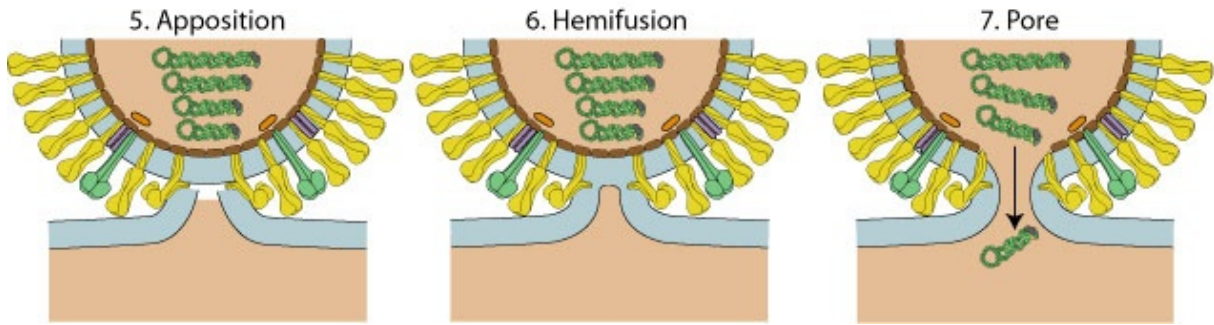


Ici une illustration pour détailler ce mode d'entrée par endocytose avec un virus enveloppé. Le virus se fixe à la membrane et entraîne une invagination de la membrane plasmique dans un puit recouvert de clathrine. Le virus enveloppé entier se retrouve donc dans une vésicule d'endocytose. Cette vésicule va fusionner avec un endosome puis un lysosome, ce qui entraîne une acidification progressive de la vésicule. Cette acidification va déclencher un changement de conformation du virus et la sortie de la nucléocapside dans le cytoplasme.

Entrée par endocytose du virus de la grippe

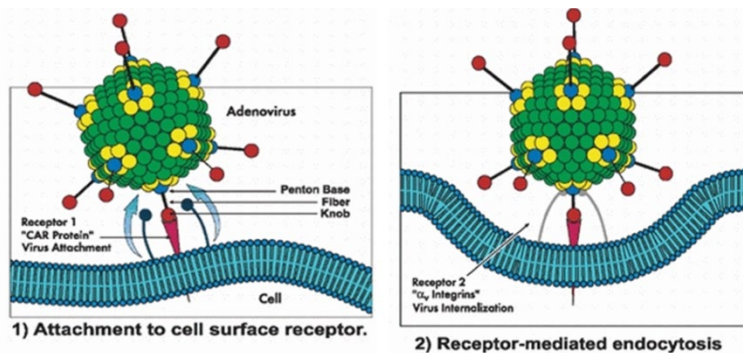
Pour le virus grippal, le pH acide des endosomes entraîne un changement de conformation de l'HA (de la partie terminale) qui permet la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de l'endosome avec libération de la nucléocapside. L'acidification entraîne un changement de conformation au sommet de HA1 qui découvre la partie terminale de HA2 hydrophobe (en vert on voit le peptide fusion) qui permet la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de l'endosome. Il existe deux hélices α dans HA2 reliées par une région non structurée dans la forme native de l'HA à pH neutre. A pH acide, cette région (en rouge) va s'organiser également en hélice α et permet de projeter le peptide de fusion à l'extérieur de la particule virale. Il pourra ainsi facilement se glisser dans la bi-couche lipidique. Une fois l'ancrage dans la membrane endosomale réalisé, il y aura d'abord hémi-fusion puis fusion complète entre l'enveloppe et la membrane endosomale. Ce pore permet le passage des nucléocapsides dans le cytoplasme.





Entrée des Adénovirus (virus nus) par endocytose

Adénovirus. La première fixation du virus à la cellule se fait via la fibre du penton avec le récepteur CAR à la surface de la cellule. Puis dans un 2^{ème} temps il y a interaction de la base du penton avec des intégrines (également à la surface des cellules), ce qui va entraîner une endocytose du virus au niveau de la membrane plasmique.



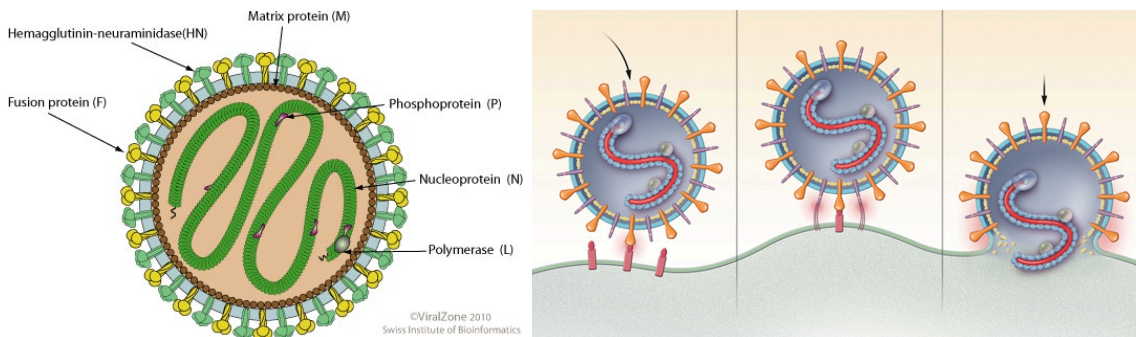
Attachement de la fibre sur le récepteur CAR

Attachement de la base du penton sur les intégrines

Entrée des virus par Fusion :

Elle s’observe seulement pour les virus enveloppés. Il s’agit d’un phénomène de fusion entre l’enveloppe du virus et la membrane plasmique, ce qui va permettre la pénétration de la nucléocapside dans le cytoplasme. Cette fusion nécessite la présence de glycoprotéines virales qui jouent le rôle de facteur de fusion. Cette fusion n’est alors pas dépendante du pH, elle se fait à un pH physiologique. Quelques exemples de virus entrant par fusion : paramyxovirus, herpesvirus, VIH

Entrée d’un Paramyxovirus



Mécanisme d’entrée d’un paramyxovirus.

Ici le Virus Sendai (un paramyxovirus) et son mécanisme d’entrée.

Il possède 2 types de spicules. Un qui porte les activités HA et NA, avec l’HA qui assure la fixation sur le récepteur cellulaire. Un second type de spicule qui porte le facteur de fusion F. Ce facteur doit être clivé

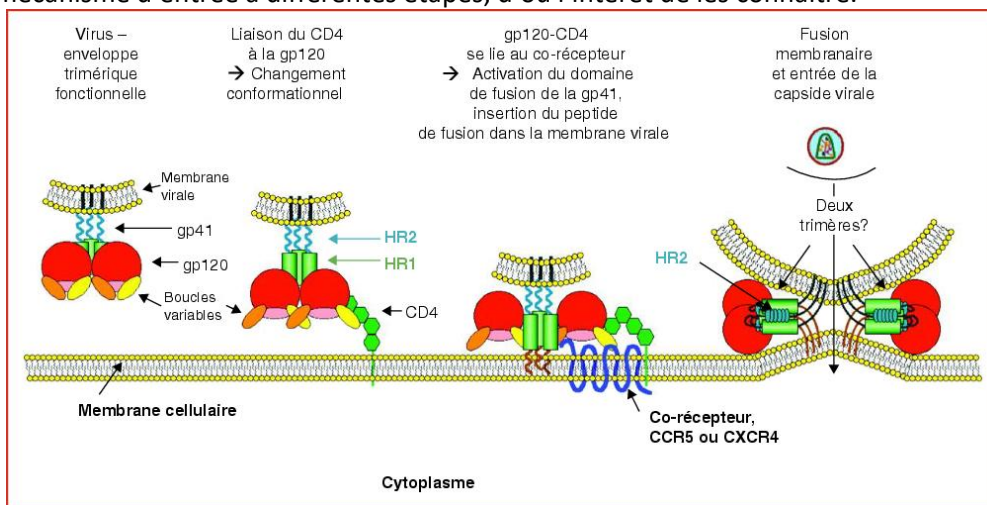
par des enzymes cellulaires en 2 sous unités, F1 et F2. F1 a une extrémité hydrophobe et pénètre dans la membrane. (F2 est une protéine plus petite, qui reste liée à F1 par des ponts disulfure).

Le virus se fixe à un récepteur puis à un corécepteur, ce qui déclenche le mécanisme de fusion entre l’enveloppe et la membrane plasmique et la pénétration de la nucléocapside.

Mécanisme d’entrée du VIH.

Le VIH possède une seule sorte de spicule à sa surface, un trimère de gp120 globulaire associé à un trimère de gp41, transmembranaire.

Il y a tout d’abord interaction entre la gp120 et la molécule CD4 à la surface des lymphocytes. Ceci entraîne un changement de conformation de la gp120. Puis la gp120 se lie à des co récepteurs (soit CCR5 soit CXCR4), ce qui entraîne le changement de conformation de la gp120, l’activation de la gp41 et la libération du peptide de fusion. Ce peptide s’insère dans la membrane cellulaire et permet la fusion des membranes et l’entrée de la capsid virale. Il existe des souches de VIH de tropismes différents CCR5 (plutôt au début) et CXCR4, mais nous reverrons cela l’an prochain. Des molécules antivirales bloquent la liaison le mécanisme d’entrée à différentes étapes, d’où l’intérêt de les connaître.



Voici un tableau qui vous présente quelques exemples de peptide de fusion de virus enveloppés. Vous trouvez à chaque fois le pH où peut se dérouler la fusion. Et dans la dernière colonne, le complexe protéique de fusion avec soulignée la protéine qui contient le peptide de fusion. Les peptides actifs à pH acide nécessiteront une endocytose du virus.

Les peptides actifs à pH physiologique permettent une entrée du virus par fusion.

Peptides de fusion des virus enveloppés

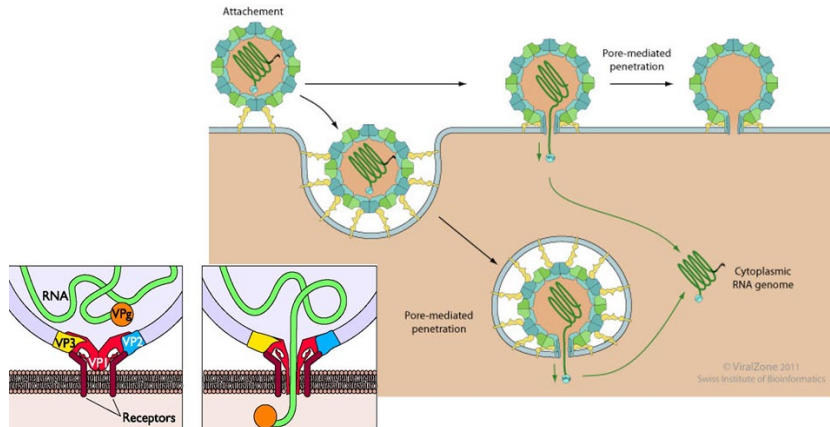
Famille	Exemple	pH de fusion	Complexe protéique de fusion
Orthomyxovirus	Grippe	acide	HA1/HA2
Togavirus	Chikungunya	acide	E1/E2/E3
Flavivirus	HCV	acide	E1/E2
Rhabdovirus	VSV, Rage	acide	G
Filovirus	Ebola	acide	GP1/GP2
Coronavirus	SARS-CoV-2	acide	S1/S2
Retrovirus	HIV	neutre	gp120/gp41
Paramyxovirus	Sendaï	neutre	F1/F2
Herpesvirus	HSV-1	neutre	gB/gD, gH/gL
Iridovirus	ASFV	ND	ND

Peptide actif à pH acide → endocytose
 Peptide actif à pH physiologique → fusion

Translocation du virus de la poliomyélite

Il y a tout d'abord fixation du virion sur le récepteur du virus de la poliomyélite (on l'appelle PVR pour *PolioVirus Receptor*), ce qui entraîne un changement de conformation. Création d'un intermédiaire avec externalisation de la protéine de capsid VP4.

La libération de VP4 permet l'insertion d'une partie N terminale hydrophobe de VP1 dans la membrane plasmique. Ceci entraîne la création d'un pore et le passage de l'ARN dans le cytoplasme et laisse une capsid vide à l'extérieur.



Sur l'illustration ci-dessus, on voit plus en détail le changement de conformation de VP1 suite à l'interaction avec les récepteurs (deux dessins à gauche). Plus récemment, cette entrée pour le moins étrange a été un peu remise en cause et on pense que le virus pourrait quand même d'abord rentrer dans une vésicule avant que ne se passe la translocation. L'autre illustration montre ceci. Les deux hypothèses ne sont pas tranchées.

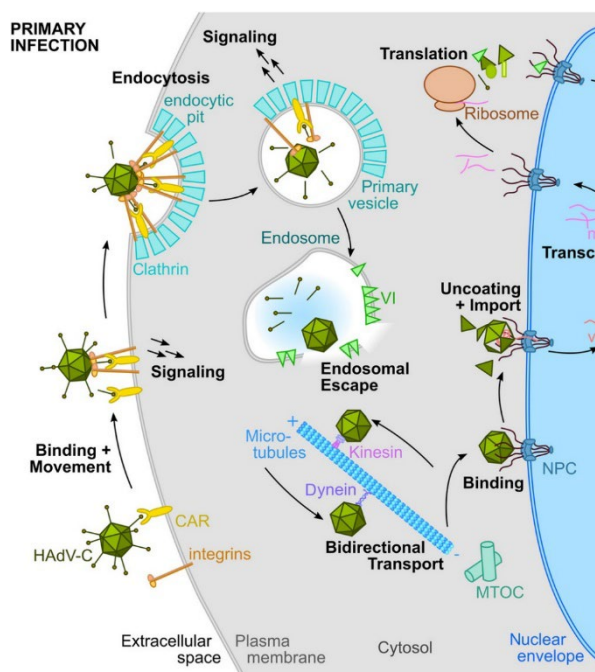
Décapsidation.

C'est la phase nécessaire pour que le génome viral puisse être libéré de sa capsid et donc accessible à la traduction et à la transcription. Celle-ci peut être totale ou seulement partielle. L'acide nucléique reste associé à des protéines mais la transcription (en ARNm) est quand même possible. C'est le cas des Réovirus.

Cette décapsidation peut se faire à différents moments : en même temps que la pénétration ou plus tardivement. Pour beaucoup de virus la décapsidation se fait en même temps que la fusion. Elle peut se faire dans différents sites cellulaires, au niveau de la membrane plasmique (par exemple le virus de la poliomyélite) ou au niveau du noyau (par exemple les Herpesvirus)

Elle peut se faire en une seule fois ou nécessiter plusieurs étapes. Ex adénovirus (virus qui se réplique dans le noyau). Après son entrée dans le cytoplasme, le virus perd progressivement ses pentons et ses hexons puis le virus utilise les microtubules pour aller vers le noyau ou il pénètre au niveau des pores. La décapsidation complète se fait à ce niveau.

Décapsidation des adénovirus.



Si on reprend l'ensemble du mécanisme d'entrée d'un Adénovirus, il se fixe à son récepteur CAR via la fibre puis à l'intégrine, via la base du penton. Il rentre par endocytose, via un puit recouvert de clathrine. Le virus perd ensuite progressivement sa capsid, notamment les fibres de ses pentons. L'acidification de l'endosome y contribue. Une capsid partiellement dégradée chemine vers le noyau via les microtubules puis le génome viral pénètre dans le noyau au niveau des pores.

FEBS Letters, Volume: 594, Issue: 12, Pages: 1861-1878, First published: 30 May 2020, DOI: (10.1002/1873-3468.13848)

En général la décapsidation des virus est prise en charge par des protéines cellulaires. Le virus n'a pas besoin de fabriquer sa propre enzyme de décapsidation. Il y a des exceptions bien sûr. Les Poxvirus nécessitent l'expression d'un gène viral qui permet grâce à un ARNm ultra précoce de synthétiser une décapsidase virale qui va détruire la capsid dans le cytoplasme.