

Subversion de l'immunité innée et adaptative par les virus

Philippe Sansonetti
Leçon #5
Collège de France
26 Janvier 2012

Des virus et des hommes...

Les virus sont les pathogènes les plus divers, les plus abondants et présentent une capacité d'évolution, donc d'adaptation, exceptionnelle. Ils ont représenté un des défis majeurs rencontrés par le système immunitaire, inné et adaptatif / spécifique et ont contribué à sa complexité.

L'intimité absolue avec les cellules requise pour leur réplication / survie les a amenés à développer des stratégies diverses et sophistiquées de subversion de l'immunité.

La co-évolution des virus avec leur hôte (humain) immunocompétent a en général atteint un équilibre marqué par un degré limité de pathogénicité, respectant cet hôte et permettant ainsi une réplication et une dissémination virale efficace. Inversement: hypervirulence des virus émergents chez l'homme après saut d'espèce (fièvres hémorragiques, VIH), en comparaison de leur faible pathogénicité (éventuellement portage chronique) chez les grands primates d'origine.

Des virus et des hommes...

L'infection virale des cellules déclenche une réponse innée antivirale dominée par l'expression des Interférons (IFN) de Type I (IFN-alpha et beta) et de cytokines / chimiokines pro-inflammatoires.

Le rôle central des IFN de Type I dans l'orchestration de la réponse immunitaire innée aux virus est démontré *in vitro* et *in vivo* (Sadler AJ & Williams BR. 2008. Nat. Rev. Immunol.).

Les souris déficientes dans le récepteur aux IFN de Type I (IFNAR) sont (hyper)sensibles à l'infection par de nombreux virus par perte des mécanismes de détection et de contrôle du cycle infectieux viral.

Les IFN de Type I influencent aussi considérablement l'orientation et la qualité de la réponse adaptative indispensable à l'éradication de l'infection en stimulant le "priming" des lymphocytes T auxiliaires CD4+ et cytotoxiques CD8+.

Immunité innée

Impliquée dans la défense précoce contre les infections.
Permet une réponse rapide relativement peu différenciée en fonction des pathogènes (**inflammation**).

Principaux composants:

Barrières physiques et chimiques (barrières cutanées et muqueuses).

Systèmes de détection

Cellules phagocytaires/présentatrices (PNN, monocytes, DC).

Voie alternative du complément.

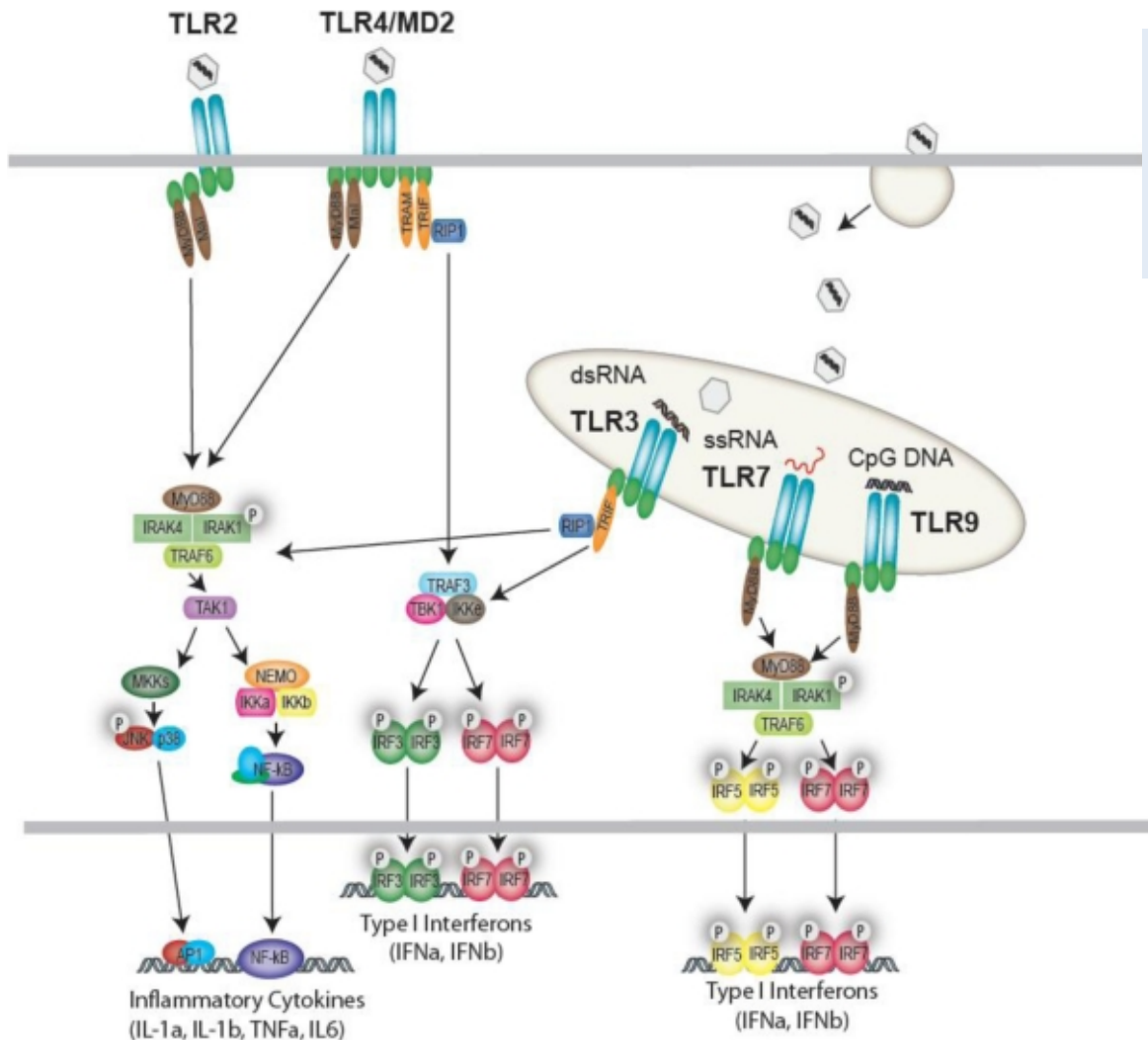
Cellules NK

Interférons alpha et beta (IFN de Type I) qui modulent la production de virions

Dix dernières années marquées par l'identification des senseurs des virus par l'hôte infecté (TLR, RLR)

Reconnaissance de surface et endosomale des virus par les TLR

Thomson MR et coll. 2011. Viruses

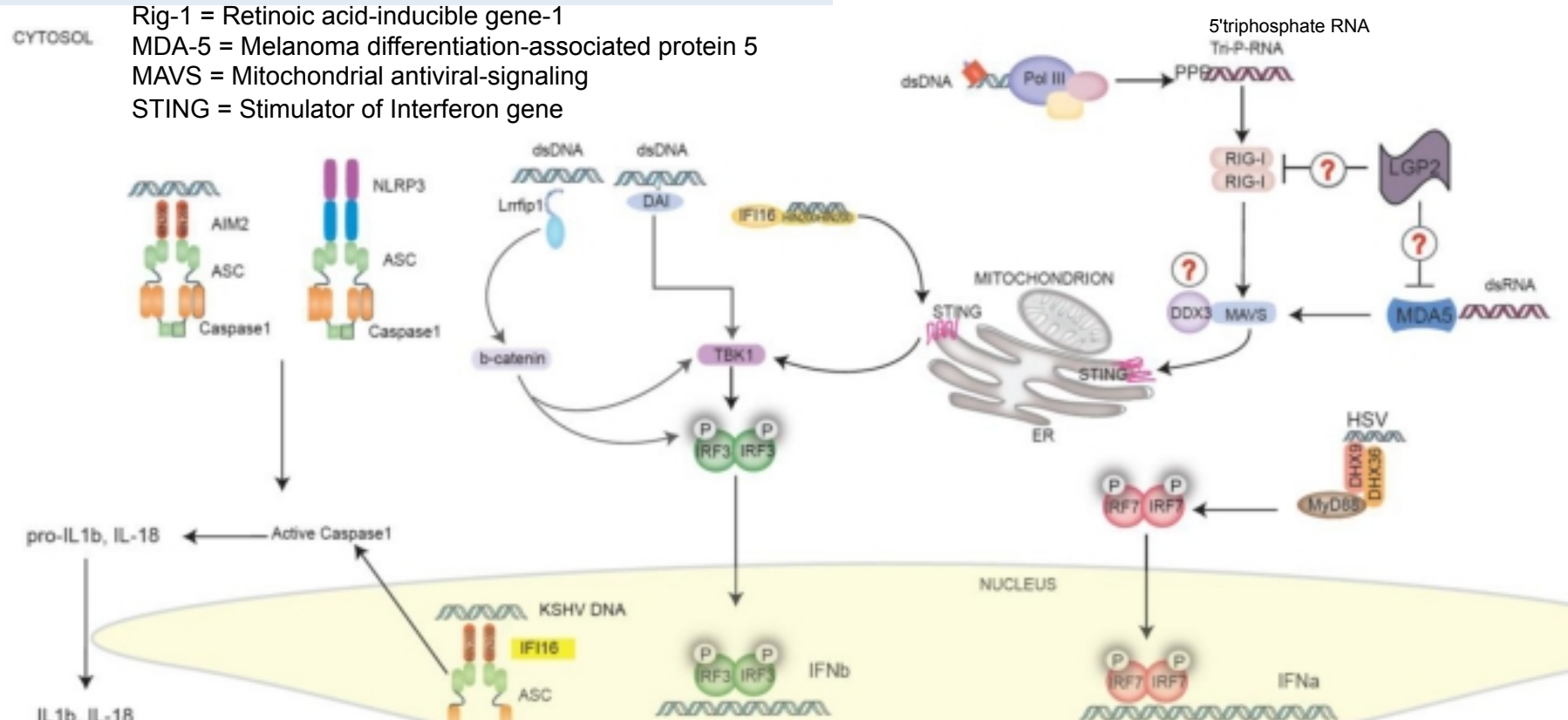


TLR2 répond à une variété de virus résultant en l'activation de la voie NF-κB et MAPK via MyD88. TLR4 répond à des protéines virales (protéine F de RSV) qui activent une voie MyD88-dépendante et MyD88-indépendantes. La voie MyD88-dépendante induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires, alors que la voie MyD88-indépendante est régulée par TRAM/TRIF et les kinases de la voie IKK qui entraînent l'activation de la production d'IFN de type I.

Dans l'endosome, TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 perçoivent les acides nucléiques viraux et entraînent l'activation de IRF3 (TLR3), ou IRF3 / IRF7 (TLR7,8,9) induisant la production d'IFN de Type 1

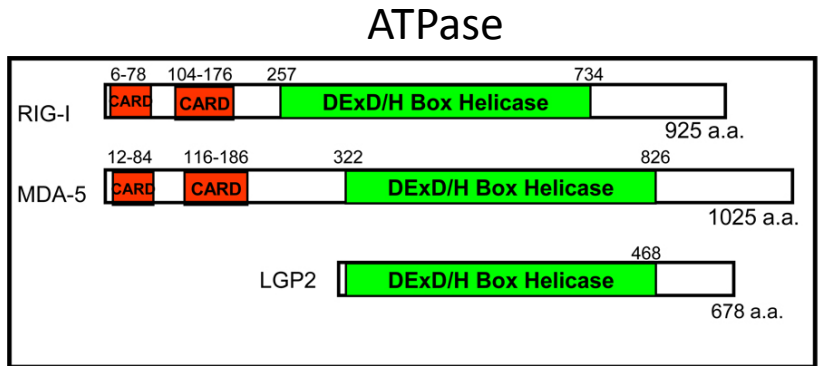
PRR nucléaires et cytosoliques

Thomson MR et coll. 2011. Viruses

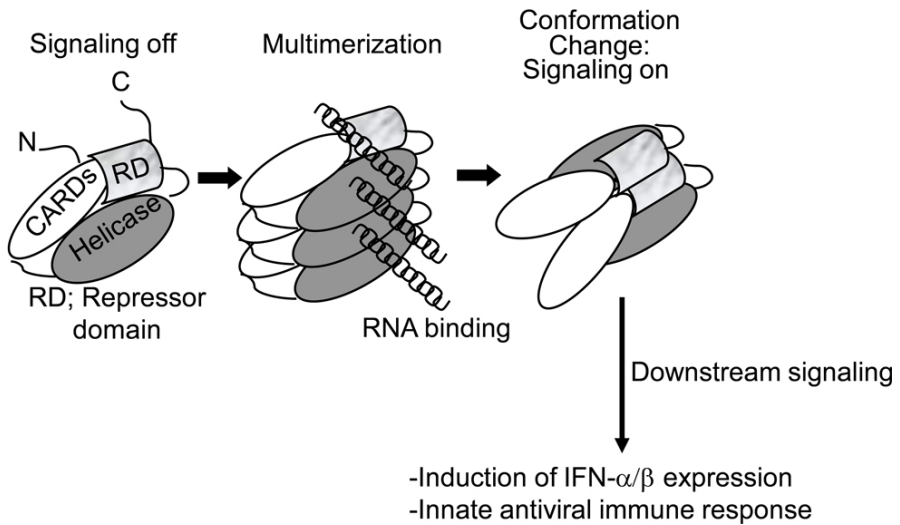


Une multitude de senseurs, IFI16, RNA Polymérase III, DAI, LRRFIP1, DDX9/36 reconnaissent l'ADN et induisent une réponse IFN de type I et la production de cytokines. RIG-1 et MDA5 reconnaissent l'ARN dans le cytosol. L'ensemble de ces molécules convergent vers STING dans le cas de l'ADN ou MAVS dans le cas de l'ARN. STING & MAVS engagent les voies TBK1-IRF3 ou IKKb-NF-kB induisant respectivement la production d'IFN de type I et des cytokines inflammatoires. AIM2 lie l'ADN double brin (dsDNA) et NLRP3 répond (indirectement) à l'ARN donnent lieu dans le cytosol à l'assemblage de l'inflammasome comportant la protéine ASC et Caspase-1. IFI16 peut aussi reconnaître l'ADN dans le noyau durant l'infection par KSHV. IFI16 nucléaire engage ASC, activant caspase-1 dans le cytosol. L'activation de caspase-1 permet maturation et libération de IL-1beta et IL-18.

RLR



Yoneyama et coll. 2004. Nat. Immunol.



Haut: Structure de RLR montrant les domaines fonctionnels.
 Bas: modèle en trois étapes de l'activation de Rig-1 d'une forme inactive monomérique (gauche) à une forme dimérique liant l'ARN (centre) à la forme active (droite). RD = domaine répresseur. L'engagement du ligand par Rig-1 facilite un changement conformationnel qui lève, l'autorépression par RD.

Wilkins C & Gale M Jr. 2010. Current Opin. Immunol.

Reconnaissance des virus par les PRR

Perception/discrimination des différentes classes de virus

dsDNA = Poxvirus, Herpesvirus... : TLR9 et senseur cytosoliques (IFI16, DAI..., AIM-2 ?)

dsRNA = Rotavirus, Blue tongue virus: TLR3, MDA-5

ssRNA + (transcription directe) produisent un intermédiaire dsRNA pendant leur réplication =

Picornavirus (polio, HAV): MDA-5; Flavivirus (Fièvre Jaune, HCV, West Nile): MDA-5 & Rig-1.

Coronavirus (SRAS): Rig-1 & MDA-5.

Rétrovirus (VIH, HTLV): TLR7 & TLR8. Rôle possible des RLR du fait de la rétrotranscription en ADN.

ssRNA - = orthomyxovirus (Influenza A), paramyxovirus (rougeole, oreillons, RSV, parainfluenzae 5), Rhabdovirus (Rage, VSV), Hantavirus, LCV, Borna, Ebola (produisent de petites quantités de dsRNA durant leur cycle): leur génome ssRNA peut être reconnu par TLR7 & Rig-1.

Immunité spécifique / adaptative

Plus spécifiquement dédiée à la défense anti-infectieuse

Stimulation par l'exposition à des antigènes (réponse primaire et secondaire)

Caractérisée par la spécificité des réponses

Principaux composants:

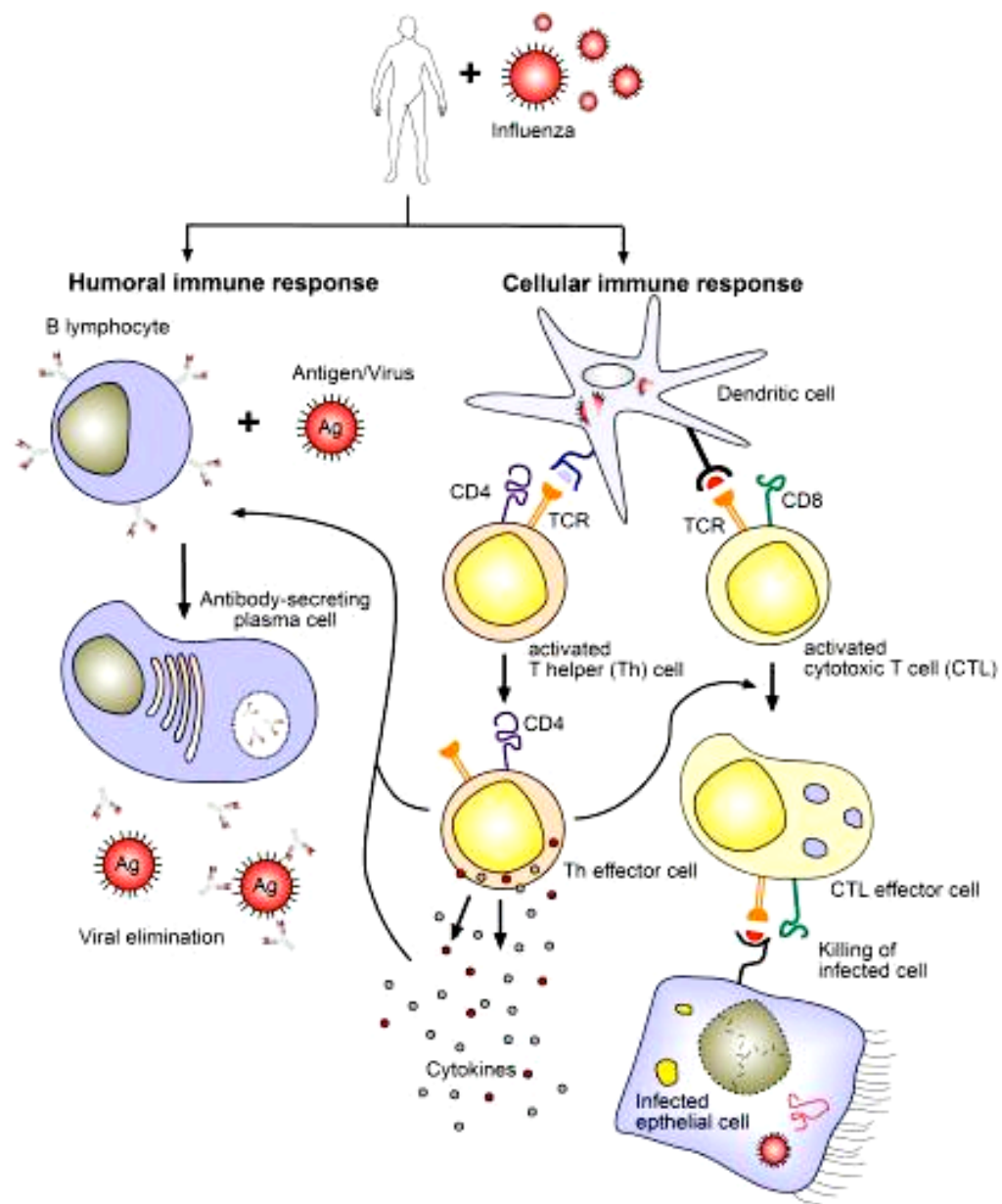
Immunité humorale (lymphocytes B et anticorps)

Immunité cellulaire (cellules T CD4+ "helper" reconnaissant les antigènes viraux dans le contexte de leur présentation par les antigènes de Classe II du MHC des cellules présentatrices de l'antigène (APC) comme la cellule dendritique (DC).

Cellules CD8 reconnaissant les antigènes viraux dans le contexte de leur présentation par les antigènes de classe I du MHC des cellules infectées par le virus.

Cytokines activant la réponse inflammatoire et initient / orientent la réponse adaptative et chimiokines attirant les cellules vers le site d'infection

Modèle de réponse intégrée anti-virale: virus Influenza



Deux types majeurs d'infections virales

Infection aiguë (grippe)

Accroissement initial très rapide du nombre de particules virales associé à une activité cytolitique importante. Le virus est partiellement contrôlé par la réponse innée qui donne lieu à des lésions tissulaires de nature inflammatoire.

Le virus est totalement éliminé par le développement d'une réponse immunitaire adaptative de type cellulaire.

Infection persistante (HBV ou HCV causant hépatite chronique / cancer)

La production virale est continue, mais à bas niveau durant toute la durée de vie de l'hôte. Peu de cellules subissent un cycle infectieux lytique.

Deux variantes de l'infection persistante:

- Infections latentes (HSV) au cours de laquelle une phase initiale d'infection aiguë est suivie par une phase quiescente (le génome viral est présent, mais il n'y a pas d'infection productive) et des poussées de réactivation peuvent survenir.
- L'infection productive persiste, mais à bas niveau (VIH) et une période de plusieurs années peut séparer la primo-infection de l'apparition des symptômes.

Comment les virus persistent-ils dans un hôte immunocompétent ?

Le fait que les virus ciblent virtuellement tous les mécanismes et toutes les étapes de l'établissement de la réponse immunitaire de l'hôte de manière à y survivre et à s'y répliquer soulignent l'importance vitale de ces réponses pour éliminer l'infection virale.

L'importance et la diversité de ces effecteurs / mécanismes viraux anti-immunité dépend de la taille des génomes viraux et de l'importance de la pression sélective subie.

Comment les virus persistent-ils dans un hôte immunocompétent ?

Inhibition de la présentation des antigènes par le MHC de Classe I

Interférence avec l'épissage des antigènes

Inhibition du transport des peptides par le complexe TAP

Inhibition de l'expression en surface des antigènes de Classe I

Inhibition de la présentation des antigènes par le MHC de Classe II (APC)

Inhibition de l'expression en surface des antigènes de Classe II

Interférence avec la voie d'endocytose

Inhibition de l'expression des molécules du MHC de Classe II par l'IFN

Inhibition de la lyse cellulaire causée par les cellules NK

Expression de molécules virales homologues des molécules du MHC de Classe I

Interférence avec les mécanismes d'apoptose

Inhibiteurs viraux de l'activation des caspases

Expression d'homologues viraux de Bcl-2

Inhibition de p53

Manipulation de l'expression de cytokines et de chimiokines

Inhibition de l'expression de l'IFN

Suppression de la synthèse de cytokines

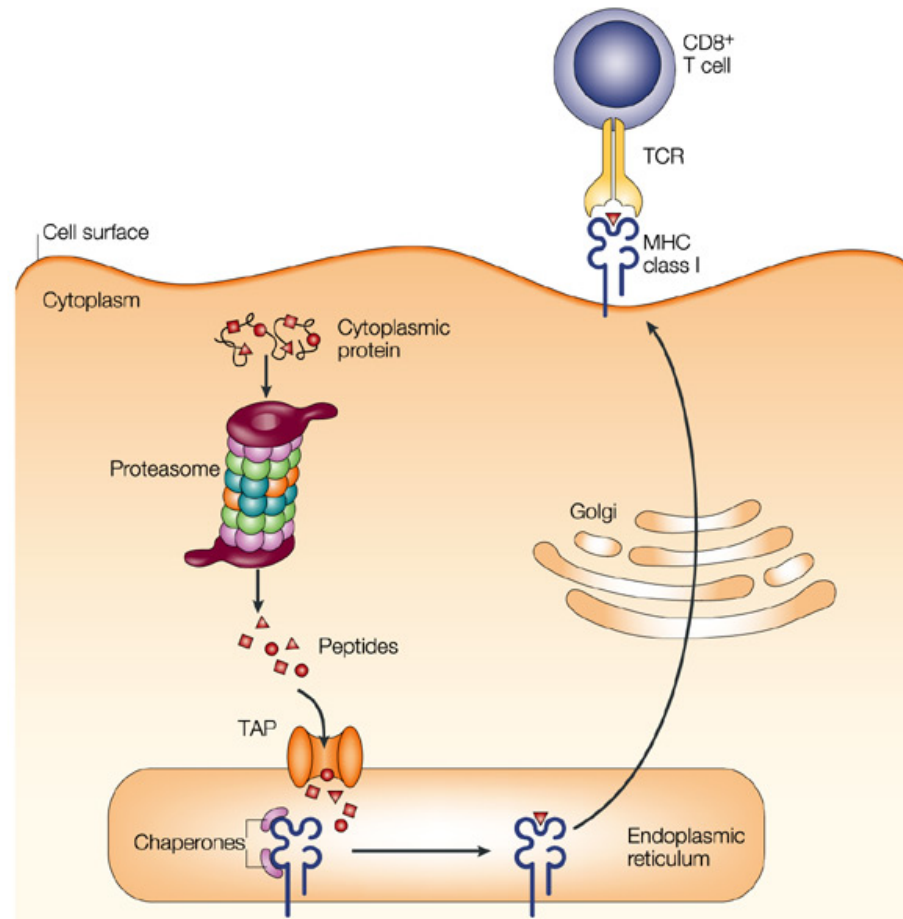
Expression de "leurres": récepteurs de cytokines et chimiokines d'origine virale

Autres

Inhibition de la présentation des antigènes par le MHC de Classe I

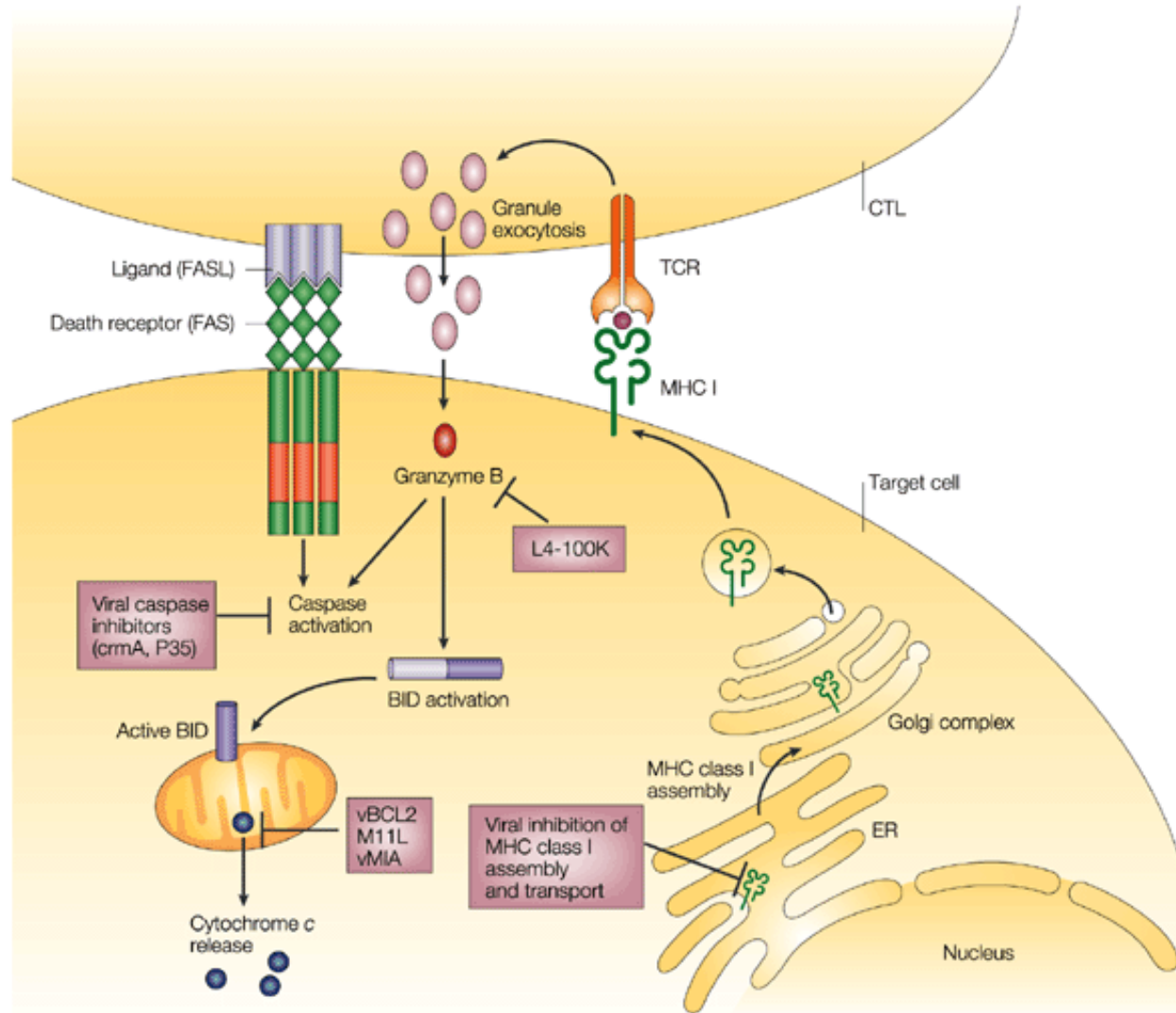
Présentation des antigènes viraux cytoplasmiques par le MHC de Classe I:

- Synthèse de nouvelles protéines dans le cytoplasme
- Ciblage de ces protéines vers le protéasome après ubiquitination
- Digestion des protéines en fragments peptidiques dans le protéasome
- Transport des fragments peptidiques dans la lumière du réticulum endoplasmique par le transporteur TAP présent dans la membrane du ER.
- Chargement des peptides sur la poche d'une molécule MHC de Classe I nouvellement synthétisée (chaîne lourde alpha et B2-microglobuline)
- Transport des molécules du MHC chargées vers le Golgi puis vers la surface cellulaire



Nature Reviews | Immunology

Lymphocytes T (CD8) cytotoxiques: les routes de la mort de la cellule infectée



Nature Reviews | Immunology

Barry M & Bleackley RC. 2002. Nat. Rev. Immunol.

Revue essentielles

Ploegh HL

Viral strategies of immune evasion

Science, 1998, 280:248-253

Alcami A

The interaction of viruses with host immune defenses

Current Opin.Microbiol. 2010. 13:501-502

+ 5 articles sur des aspects récents du sujet dans le même numéro

Inhibition par les virus de la présentation des antigènes par le MHC de Classe I

Interférence avec l'épissage des antigènes

EBV: EBV Nuclear Antigen A1 (EBNA1) contient des répétitions Gly-Ala qui inhibent le processus de dégradation des protéines virales par le processus d'ubiquitination protéolyse par le protéasome (Levitskaya J et coll. 1997. PNAS)

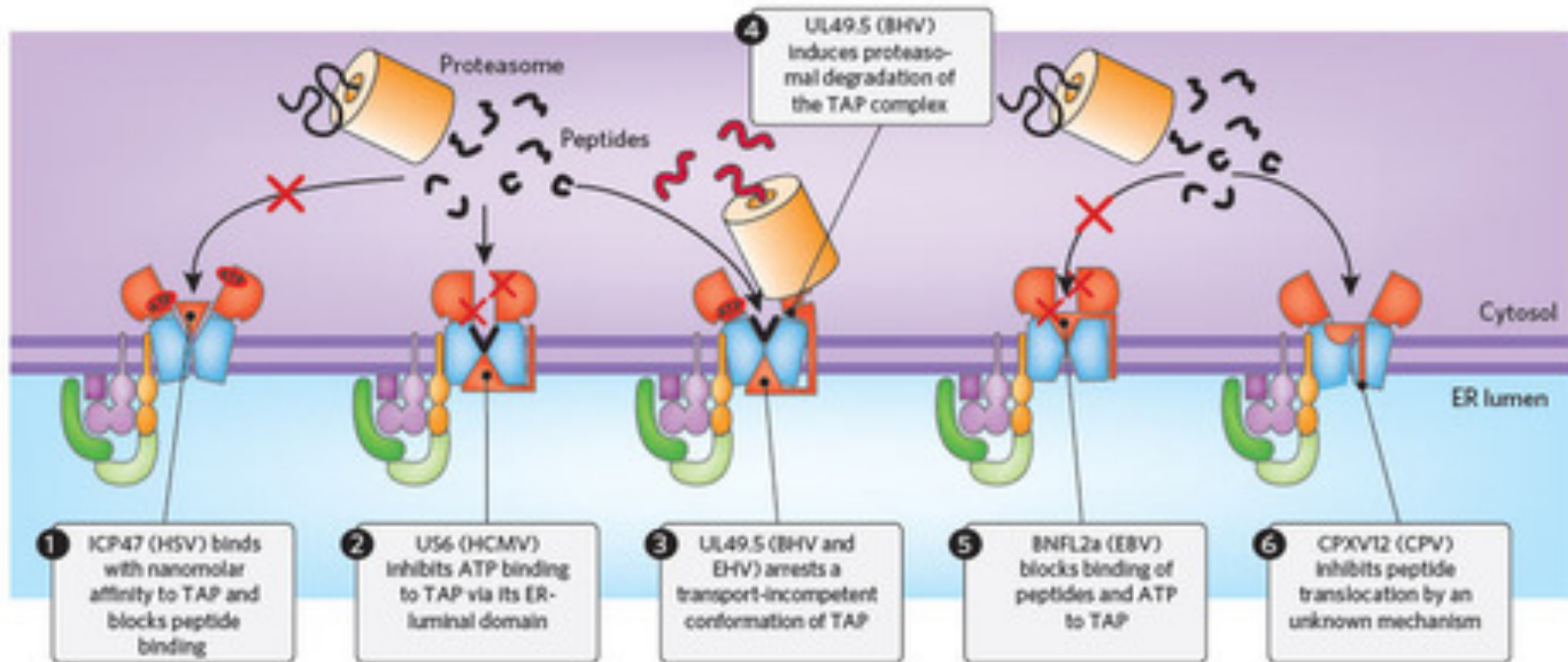
CMV: Durant la phase immédiate-précoce du cycle viral de HCMV, des réponses CTL sont générées contre des peptides antigéniques dérivées d'un facteur viral de transcription de 72 kDa. Une phosphoprotéine de 64 kDa inhibe la dégradation de p72 (Hengel H et coll. 1998. Trends Microbiol.)

Inhibition du transport des peptides par le complexe TAP

HSV1 & 2 expriment une protéine IE (immediate-early) **ICP47** qui interagit avec les sous-unités TAP1 & 2 avec une affinité x10 000 par rapport aux peptides transportés. Inhibition compétitive +++ (Parcel D & Tampé R. 2010. Nat. Chem. Biol.)

HCMV: le gène US6 transcrit dans les phases précoces et tardives de réplication du virus code une glycoprotéine de 22 kDa qui inhibe les fonctions de transport de TAP en interagissant avec le processus de liaison de l'ATP. Cette inhibition est réversée par l'IFN-gamma (Lehner PJ et coll. 1997. PNAS)

HSV: IE protéines assurent les phases précoces de la réplication virale



Le facteur cytosolique ICP47 (IE12) des virus herpes HSV1 et HSV2 bloque la liaison du peptide transloqué par le TAP avec une affinité nanomolaire. Il prévient l'activation de l'hydrolyse de l'ATP induite par la liaison du peptide et sa translocation du cytosol à l'ER. Inhibition compétitive. Affinité $\times 10\ 000$ / peptides transportés.

York I et coll. 1994. Cell
Ahn K et coll. 1996. EMBO J.
Hill A et coll. 1995 Nature
Tomazin R et coll. 1996. EMBO J.

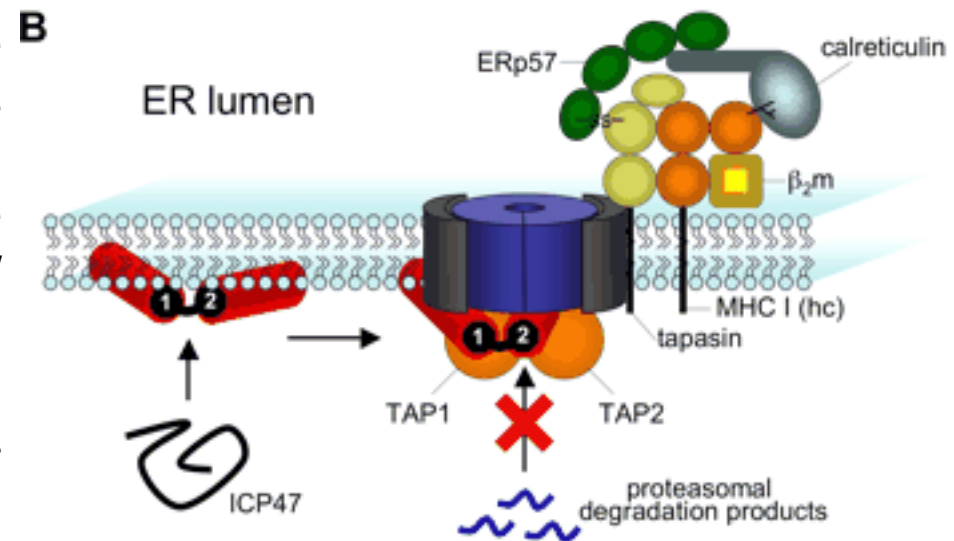
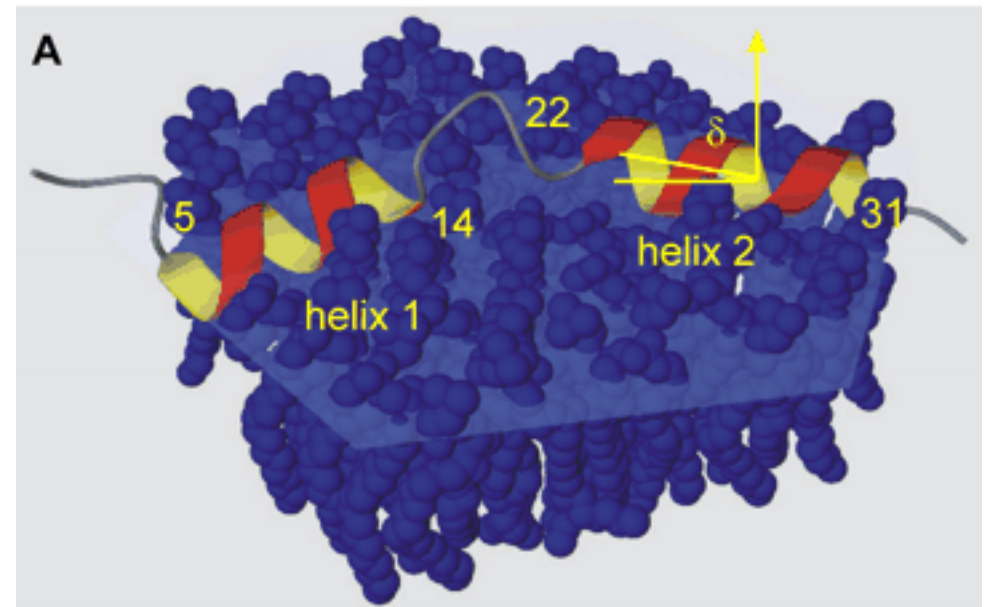
Modélisation du domaine actif de ICP47

Visualisation du domaine actif de liaison à TAP (Hélice-boucle-hélice).

Après liaison à la surface cytosolique de la membrane du ER, ICP47 adopte une structure "hélice-boucle-hélice".

L'interaction qui s'ensuit avec la structure de chargement des peptides à l'interface lipide-TAP bloque la livraison de ces peptides au complexe MHC Classe I.

Le complexe de chargement du peptide comporte: la cassette de liaison de l'ATP/ sous unités transporteuses de TAP1 & 2, la molécule adaptatrice Tapasine, la chaîne lourde (hc) du MHC, la beta2-microglobuline associée de façon non covalente et des protéines auxiliaires: calnexine et la thiol-oxidoreductase ERp57.



Inhibition par les virus de la présentation des antigènes par le MHC de Classe I

Inhibition de l'expression des molécules du MHC de Classe I à la surface des cellules infectées

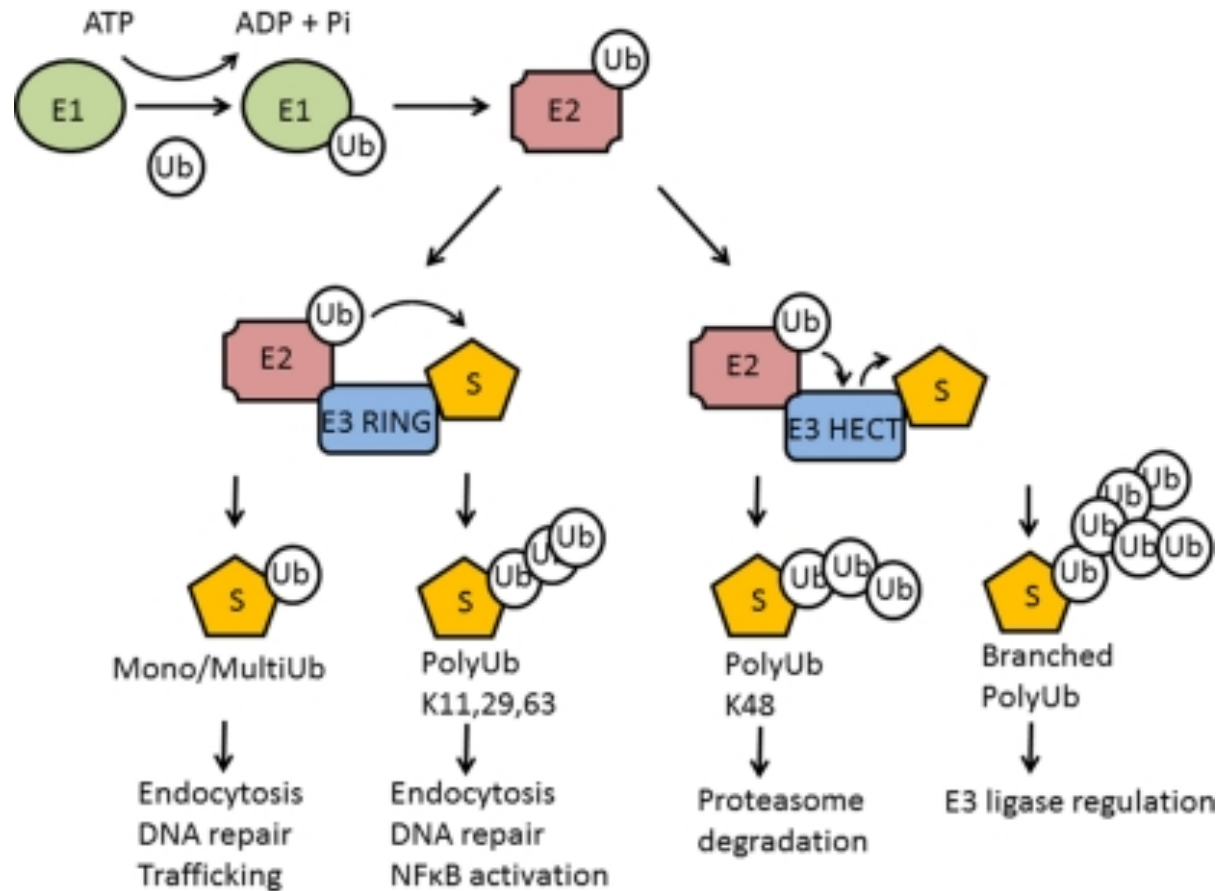
Adénovirus E (virus faiblement oncogène) produit une protéine précoce, E3-19K qui forme un complexe avec le complexe de Class I naissant dans le ER.

L'extrémité C-term de E3-19 possède un motif de rétention dans le ER qui va ancrer le complexe E3-19-MHC dans la membrane du ER (Deryckere F & Burgert HG. 1996. J. Virol.).

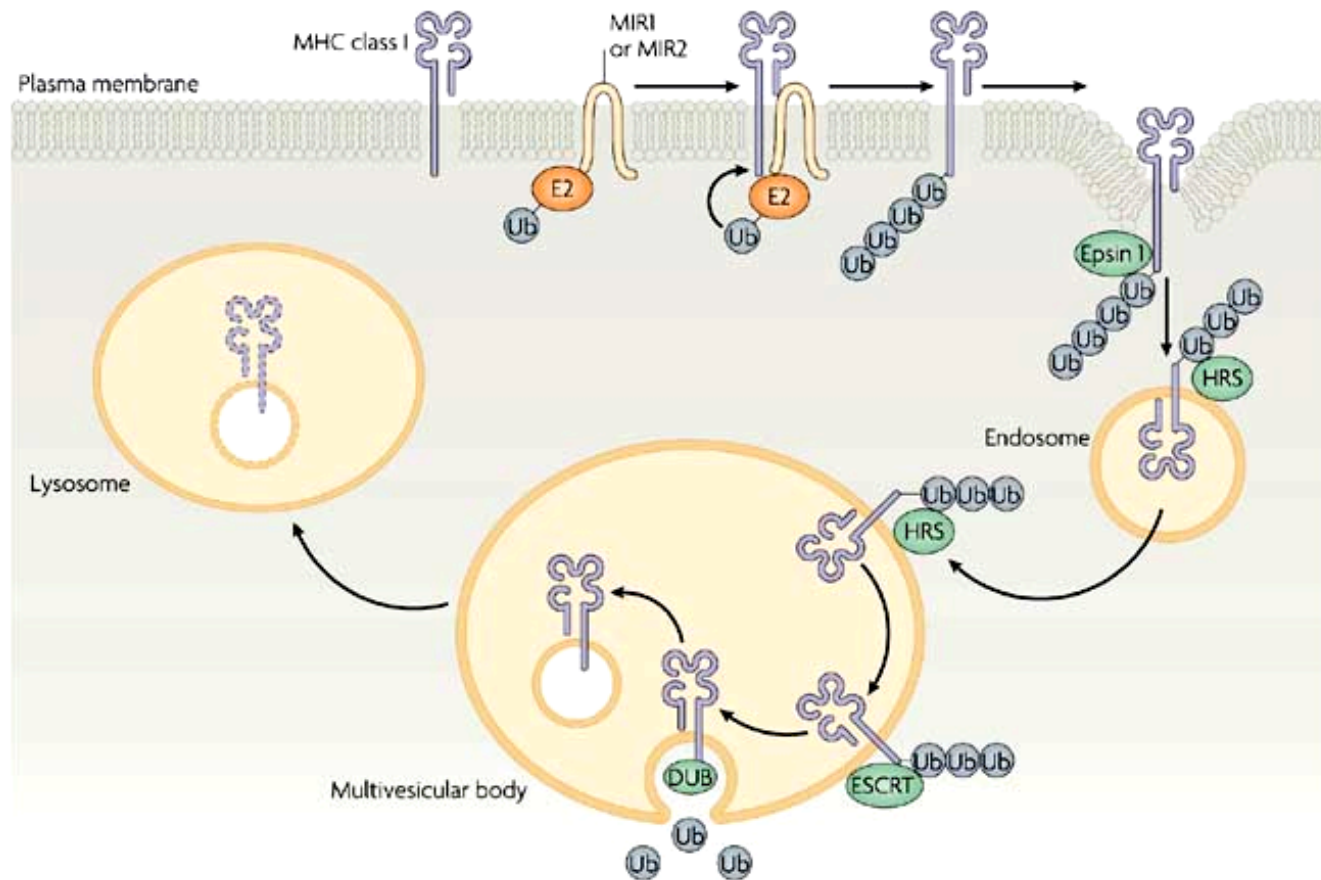
HCMV: la protéine "immediate-early" US3 interagit avec le complexe MHC de Classe I dans la lumière du ER pour en assurer la rétention. Mécanisme moléculaire ? (Jones TR et coll. 1996. PNAS)

KSHV / HSV-8: cause la disparition des molécules du MHC de Classe I de la surface cellulaire en activant leur endocytose médiée par la clathrine suivie de leur dégradation dans le compartiment endocytique. Deux protéines virales, K3 et K5, sont des enzymes de transfert de l'ubiquitine qui induisent l'endocytose des molécules du MHC de Classe I en ubiquitinant la queue cytoplasmique de la chaîne lourde (Coscoy L & Ganem D. 2000. PNAS; Coscoy L et coll. 2001. J. Cell. Biol.; Hewitt EW et coll. 2002. EMBO J.) ;

Cascades de l'ubiquitination



KSHV / HSV-8 "Modulators of Immune Recognition" MIR1 (K3) et MIR2 (K5)



Epsine 1 et HRS (Hepatocyte Growth Factor Regulated Tyrosine Kinase) = co-facteurs de l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de la chaîne lourde du MHC I pour son endocytose et son recyclage.

Nature Reviews | Immunology

MIR1/2 (K3/5) = E2 ligase

En association avec une E3-ubiquitine-conjugating-enzyme d'ubiquitiner en Lys (et cystéine) la queue cytoplasmique du MHC I

Coscoy L. 2007. Nat. Rev. Immunol.

Cibles de K3 & K5

K3 cible préférentiellement les molécules du MHC I, ainsi que CD1d, PECAM et IFNR-gamma.

K5 cible les molécules du MHC I, des molécules d'adhésion (ICAM-1, PECAM, ALCAM, VE-cadhérine), des molécules de costimulation (B7-2), des ligands pour les cellules NKT (CD1d), des ligands pour les cellules NK (MICA, MICB, AICL), des récepteurs de cytokines (IFNgamma-R1, t-SNARE et Syntaxine et un membre de la famille TGF-beta (BMPRII)

(Boname JR & Lehner PJ. 2011. Viruses, Randow F & Lehner PJ. 2009. Nat. Cell Biol.)

Thèmes "récents" concernant la manipulation du système immunitaire par les virus

- 1 - Les virus antagonisent les mécanismes de mort cellulaire
- 2 - Modulation par les virus de la fonction des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée: cellules NK
- 3 - Les virus antagonisent les réponses immunitaires innées: stratégies anti PRR et anti-IFN
- 4 - Modulation par les virus des fonctions des cellules dendritiques
- 5 - Nouveaux concepts dans les stratégies de contrôle de l'immunité par les virus: les MicroARN

1 - Interférence des virus avec l'apoptose

L'apoptose des cellules infectées par des virus survient directement du fait des conséquences de l'infection de la cellule ou indirectement par l'effet d'un environnement cytokinique (TNF...) ou de cellules cytotoxiques reconnaissant la cellule infectée (cellules NK, lymphocytes CD8 cytotoxiques)

L'apoptose diminue la production et la dissémination virale, de ce fait les virus ont en général développé des mécanismes anti-apoptotiques puissants.

Il n'est pas de molécule clé impliquée dans le déclenchement de l'apoptose :

- exogène = "death receptor" Fas, TRAIL-R1/2, TNFR;

- endogène = mitochondrie

ou dans le déclenchement de la pyroptose (NLR) qui ne soit ciblée par un effecteur viral.

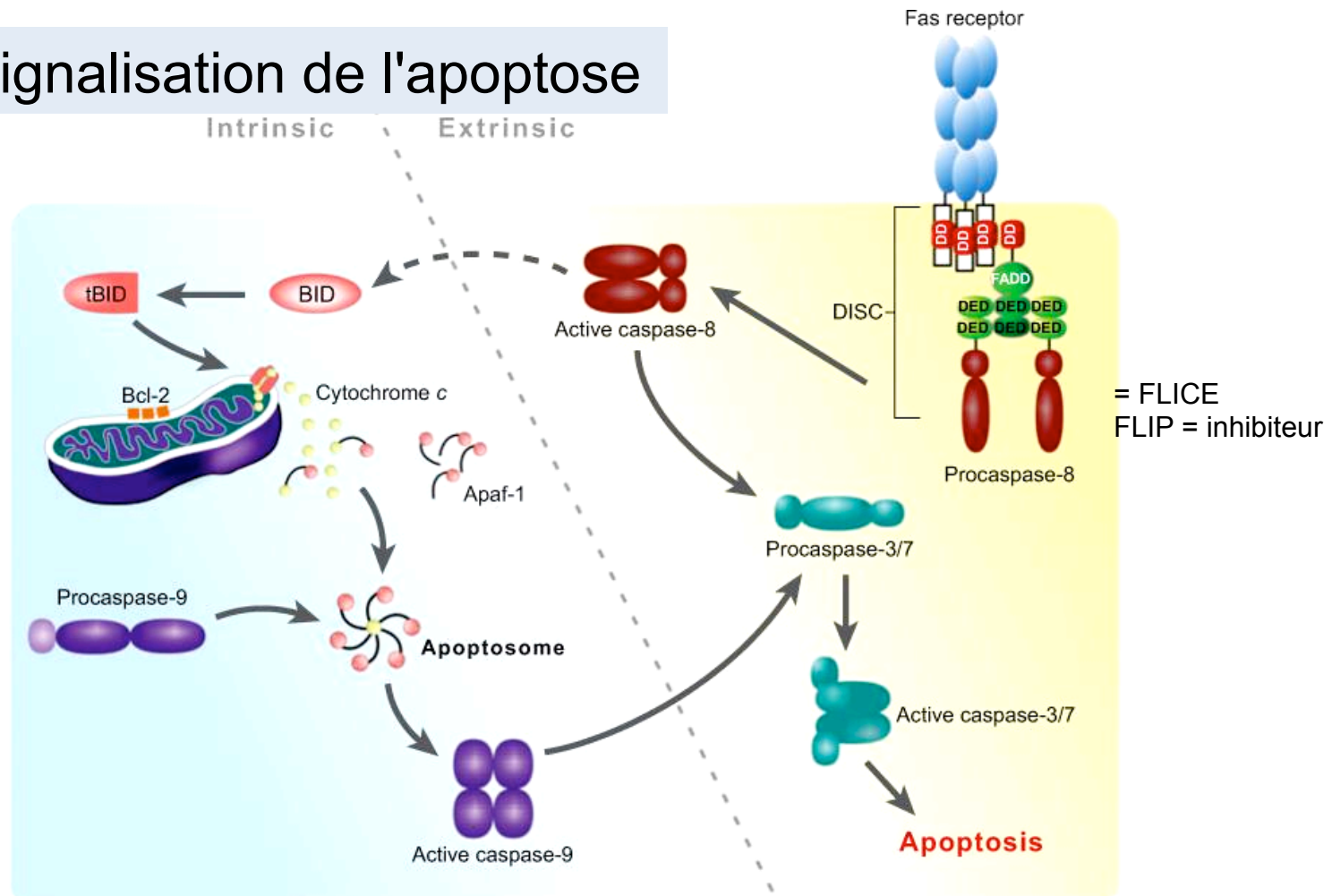
Trois grands types d'effecteurs viraux:

Inhibiteurs de enzymes responsables de l'apoptose (caspases et sérine protéases)

Homologues de Bcl-2

Inhibiteurs de p53

Voies de signalisation de l'apoptose



Voie extrinsèque: engagement du "death receptor" (ex. FasR - recrutement de l'adaptateur FADD - assemblage du "death-inducing signaling complex" (DISC) - recrutement/activation de caspase-8-clivage de caspase-3/7).

Voie intrinsèque: clivage et translocation vers la mitochondrie d'une protéine proapoptotique de la famille Bcl-2 (Bid via caspase-8) - altération de la membrane externe de la mitochondrie (pore) - libération de cytochrome c - association cytochrome c/Apaf-1 - formation de l'APOPTOSOME - recrutement/activation caspase-9 clivage de caspase-3/7.

Interférence des virus avec l'apoptose

Inhibiteurs viraux de l'activation des caspases

Inhibiteurs directs:

Poxvirus de la vaccine (VV): CrmA est un membre de la famille des serpines (inhibiteur des sérine-protéases), inhibe caspase-8 et caspase-1. Inhibiteur compétitif (Garcia-Calvo M et coll. 1998. J. Biol. Chem..)

Baculovirus: p35 inhibe caspase-1,3,6,7,8 (Xu G et coll. 2003. J. Biol. Chem.)

Inhibiteurs indirects:

Adénovirus: E3-14.7K inhibe caspase-8

E3-10.4K, E3-14.5K modulent l'expression de Fas en surface en formant un hétérodimère (RID) qui entraîne internalisation et dégradation de Fas. E3-6.7K régule négativement celle de TRAIL-R1/2

Gamma Herpes Virus: homologues de FLIP (FLICE-inhibitory proteins) = **vFLIP** recrutés à DISC. Inhibition du recrutement/activation de caspase-8 (Bertin J et coll. 1997. PNAS)

Best SM. 2008. Ann. Rev. Microbiol.

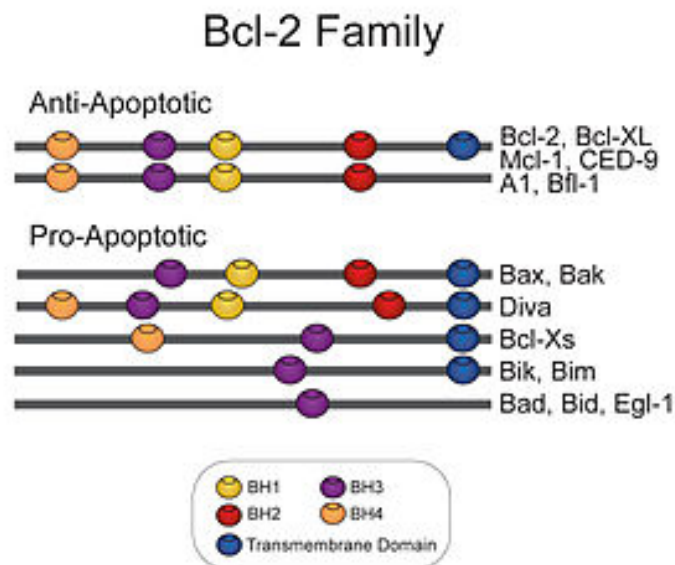
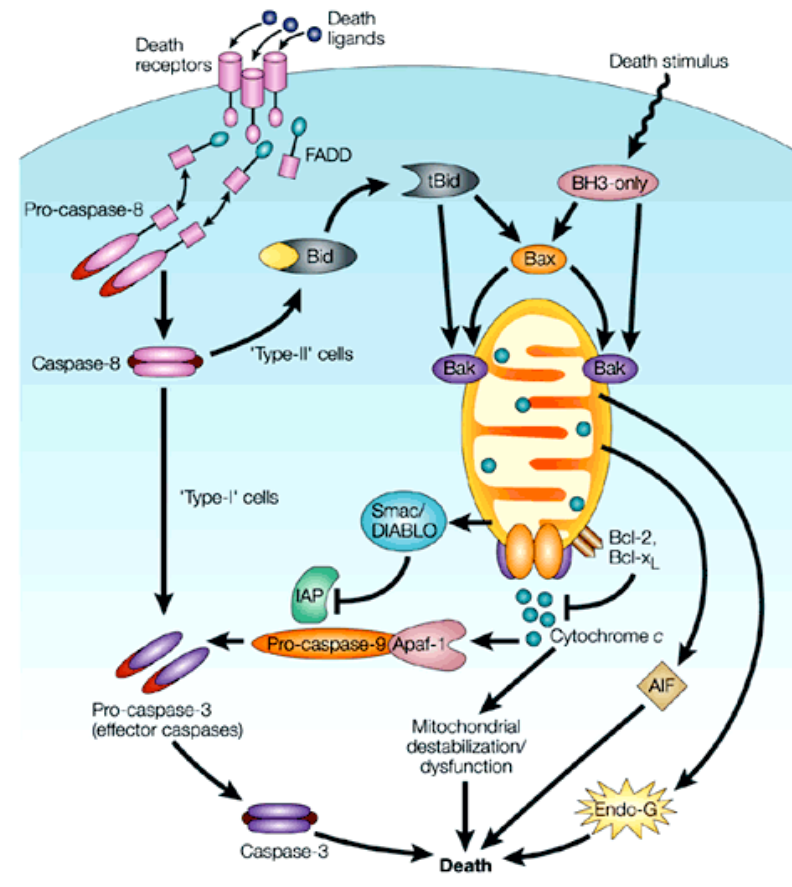
Interférence des virus avec l'apoptose

Expression d'homologues de Bcl-2.

EBV: BHRF-1 & BALF-1 sont exprimés durant l'infection lytique et protègent la cellule de l'apoptose induite par TNF et Fas-ligand en bloquant la libération de cytochrome-c (Oudejans JJ et coll. 1995. Blood).

KSHV / HSV-8: expression d'un homologue de Bcl-2 (homologie EBV & HSV);

Adenovirus: E1B-19K est un homologue de Bcl-2 qui se lie à Bak pour prévenir l'oligomérisation de Bak et Bax et la formation de pores mitochondriaux libérant le cytochrome-c (Boyd JM et coll. 1994. Cell).



Interférence des virus avec l'apoptose

Inhibition de p53

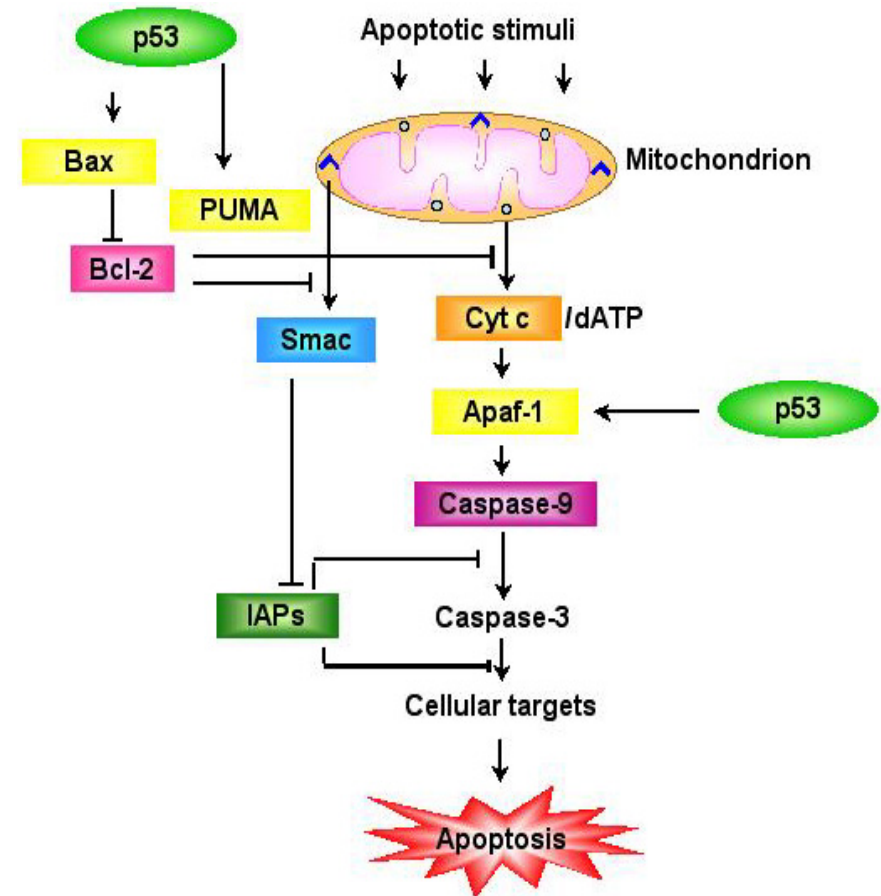
P53 induit l'apoptose en régulant positivement l'expression de Fas et TRAIL-R2 et l'expression des molécules pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Il régule aussi négativement l'expression de Bcl-2 (anti-apoptotique).

HPV: protéine E6 cible p53 pour ubiquitination / dégradation par le protéasome (Akutsu N et coll. 1996. J. Gen. Virol.)

Adénovirus: E1B.55K & E4.orf6 = idem (Li Q et coll. 2011. J. Virol.)

SV40: antigène T lie et séquestre p53 en un complexe inactif) (Mietz JA et coll. 1992. EMBO J.)



2 - Modulation par les virus de la fonction des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée: cellules NK

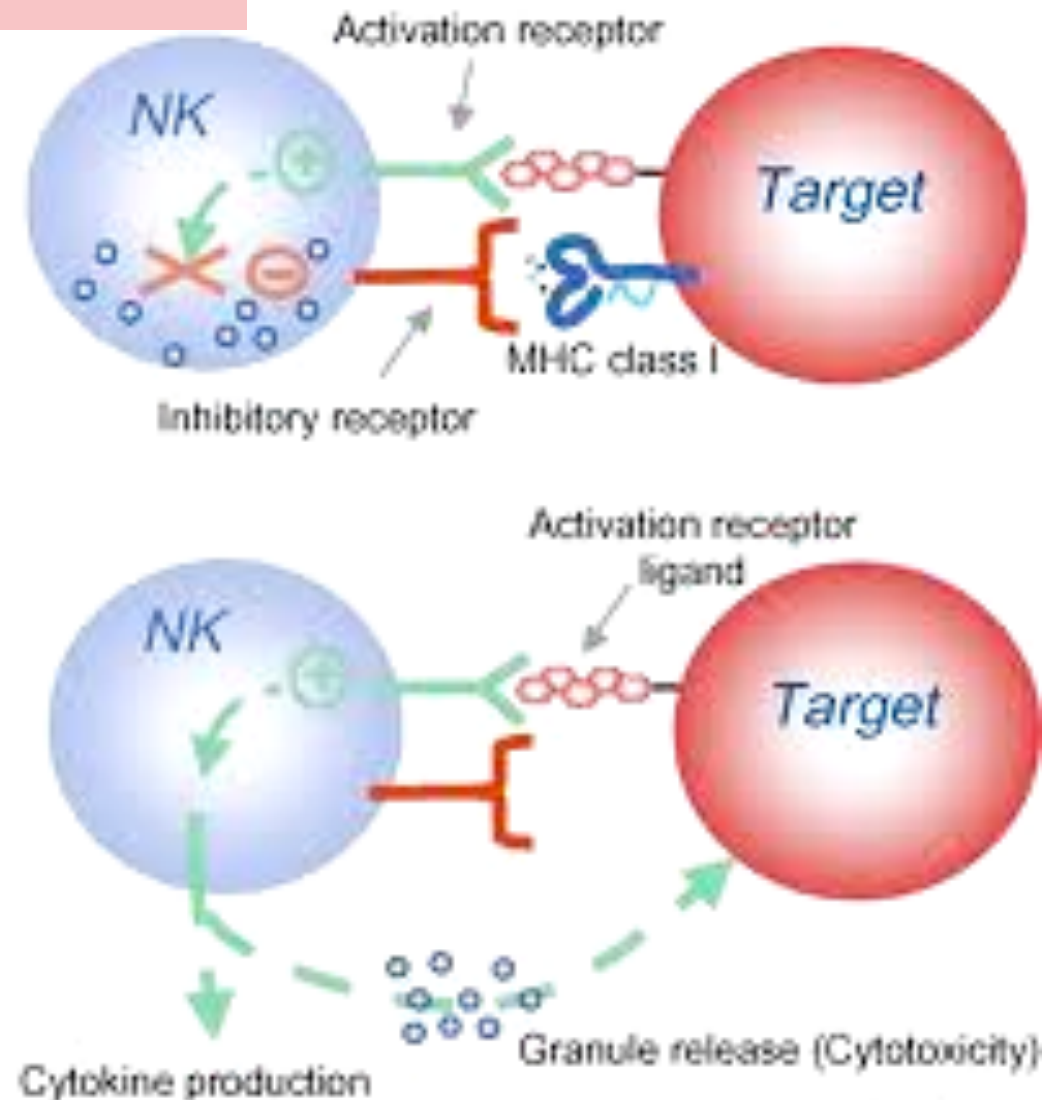
Rôle essentiel dans les étapes précoces de contrôle de l'infection virale

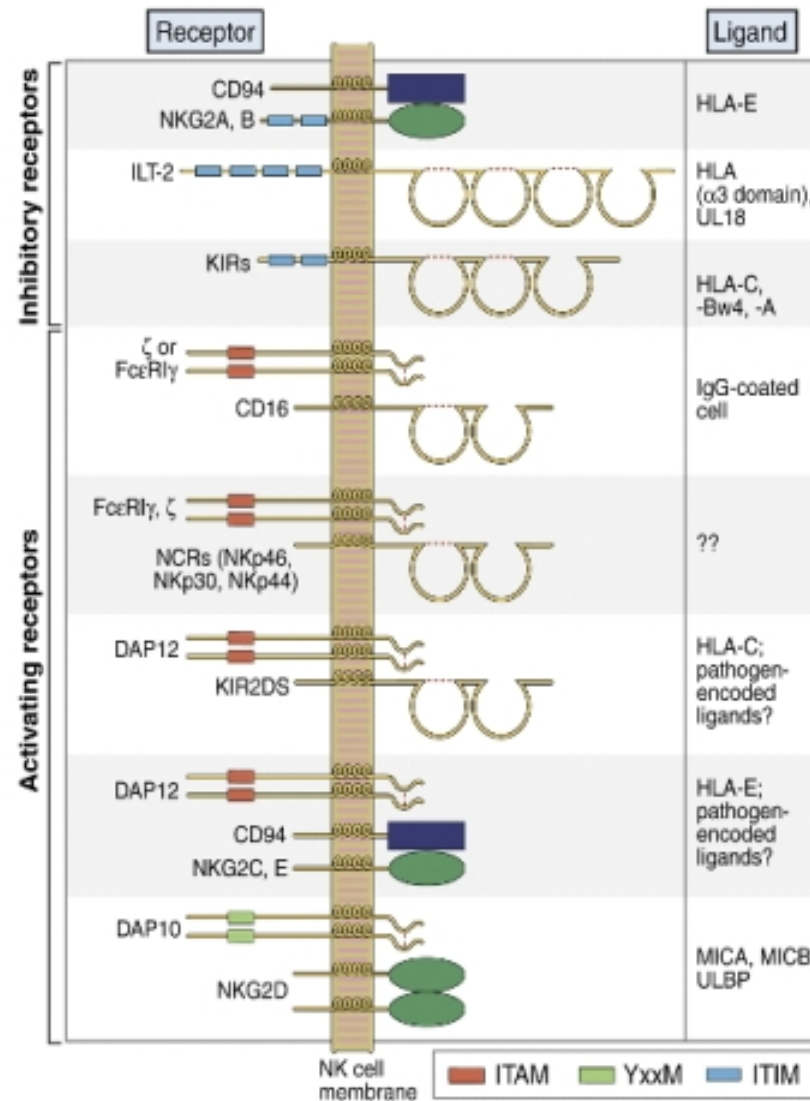
L'activation des cellules NK est contrôlée par l'intégration de signaux issus de récepteurs activateurs et inhibiteurs.

Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent les molécules du MHC de Classe I et restreignent l'activité NK.

Lorsqu'elle n'est pas antagonisée par l'engagement d'un récepteur inactivateur, l'activité NK est induite par l'engagement d'un récepteur activateur.

L'activité NK consiste en la production /sécrétion de perforines cytolytiques et de cytokines (IFN)





Examples of inhibitory and activating NK cell receptors and their ligands are shown. CD16 and the natural cytotoxic receptors (NCRs) associate with ζ chain homodimers, Fc γ homodimers, or ζ -Fc γ heterodimers. There are at least seven different KIRs, with varying ligand specificities.

Inhibition de la cytotoxicité des cellules NK par les virus

Les données récentes offrent un "paysage" complexe
(Lisnic VJ et coll. 2010. Curr. Opin. Microbiol.)

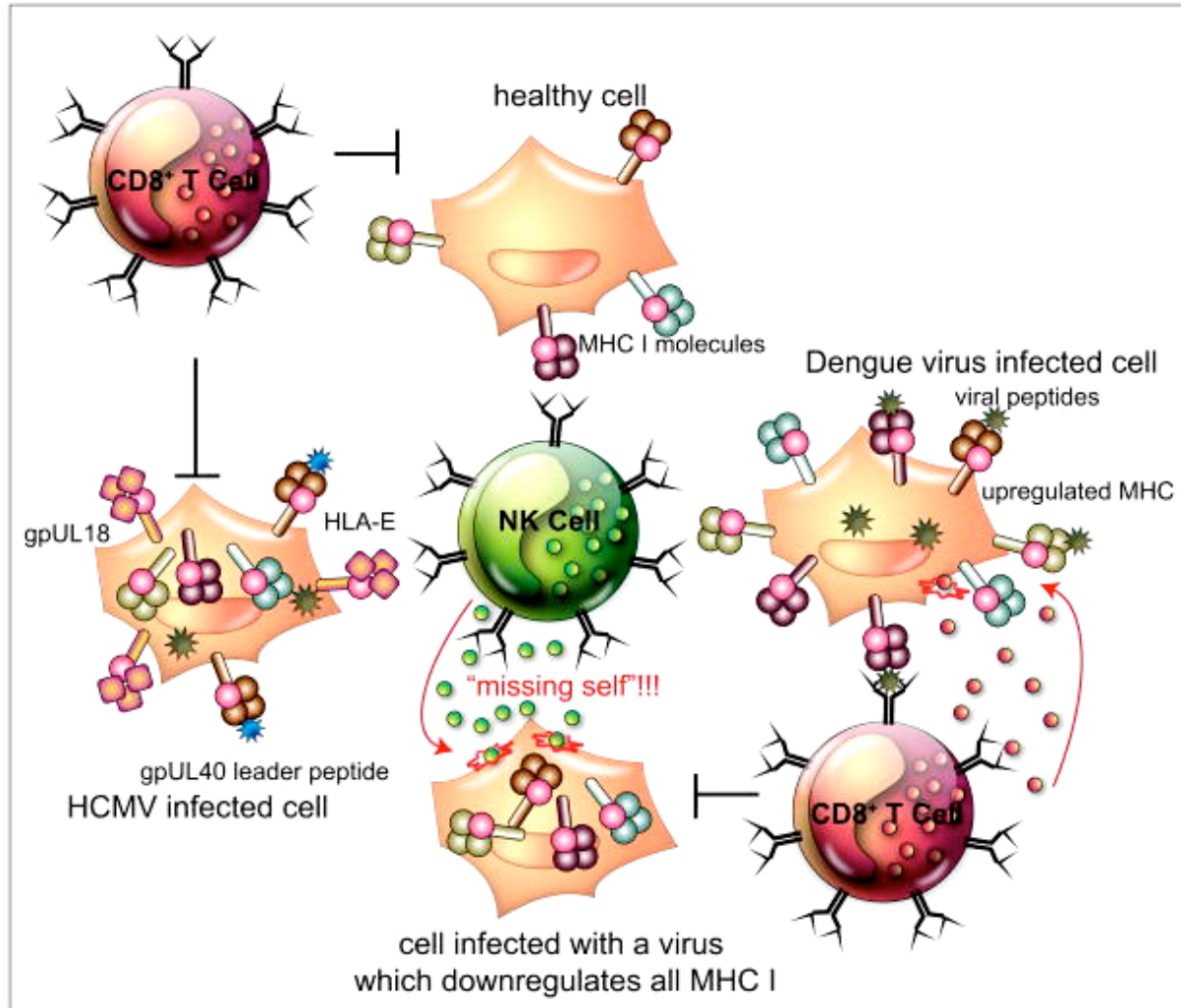
Afin d'éviter la reconnaissance par les cellules T restreintes par le MHC I, de nombreux virus régulent négativement l'expression du MHC I des cellules qu'ils infectent. Comme les molécules du MHC I représentent un des régulateurs inhibiteurs centraux de l'activation des cellules NK, cette stratégie fait courir au virus un risque de destruction rapide ("missing self recognition").

Cependant, toutes les molécules du MHC I ne présentent pas des peptides aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Les virus exploitent cette faille et peuvent aussi exprimer des "leurres" des molécules du MHC I. Certains virus comme la Dengue augmentent l'expression de CMH I en surface (Hershkovitz O et coll. 2008. J. Virol.)

Stratégies virales entraînant l'engagement des récepteurs inhibiteurs des cellules NK. Les CMV (H & M) sont maîtres en l'art de manipuler les récepteurs des NK.

En général ces effecteurs régulent négativement l'expression en surface de HLA-A et B et induisent l'expression de HLA-C et E = engage récepteur NK inhibiteur mais variété restreinte de peptides présentés. Ruptures d'équilibre activation/inhibition (m04, 06, 152, etc...).

Exemple de HCMV en comparaison d'autres systèmes:



HCMV régule négativement de manière sélective les molécules du MHC I capables de présenter les peptides viraux aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Ceci laisse la capacité aux molécules HLA-E (présentent les peptides signaux d'autres molécules MHC I) d'engager les récepteurs inhibiteurs des cellules NK. HCMV code pour gpUL40 qui va saturer HLA-E du fait de sa proximité des peptides signaux des MHC I. HCMV code aussi pour un "leurre" gpUL18, similaire aux molécules MHC I.

Inhibition de la cytotoxicité des cellules NK par les virus

Stratégies virales entraînant l'engagement des récepteurs inhibiteurs des cellules NK.

Les CMV (H & M) sont maîtres en l'art de manipuler les récepteurs des NK.

Effecteurs mimant les molécules MHC I:

Ces "leurres" doivent répondre à deux exigences. (1) Engager le récepteur inhibiteur de la cellule NK sans présenter les peptides aux cellules T. (2) Avoir un effet agoniste puissant qui dépasse les autres signaux activateurs.

HCMV: la glycoprotéine UL18 (faible homologie avec MHC I) lie la beta2-microglobuline, créant ainsi un homologue moléculaire inhibiteur des cellules NK qui lie Lir-1 avec une affinité $\times 1000$ /HLA-E. Elle est exprimée en grande quantité par un gène tardif (Browne H et coll. 1990. Nature & Wilkinson GW et coll. 2008. J. Clin. Virol.)

Poxvirus: le virus du Molluscum Contagiosum (MCV) code une protéine (MC80) qui est un homologue des molécules du MHC de classe I mais ne lie pas de peptide (Alcami A, Koszinovski UH. 2000. Trends Microbiol.).

Inhibition de la cytotoxicité des cellules NK par les virus

Prévention de l'engagement des récepteurs activateurs des cellules NK.

Outre diminuer le risque de ne pas engager les récepteurs inhibiteurs (RI), il est important, afin de manipuler le seuil de décision "attaque ou pas attaque", d'inhiber la réponse des récepteurs activateurs (RA) des cellules NK.

Interférence avec les RA:

MCMV code 4 inhibiteurs du principal RA, NKG2D:

m145 régule négativement MULT-1 (ligand de NKG2D)

m152 régule négativement la famille de ligands RAE-1

m155 régule négativement H60

m138 régule négativement H60, MULT-1 et RAE-1

De plus, comme EBV et KSHV, il cible MICB par des microARN

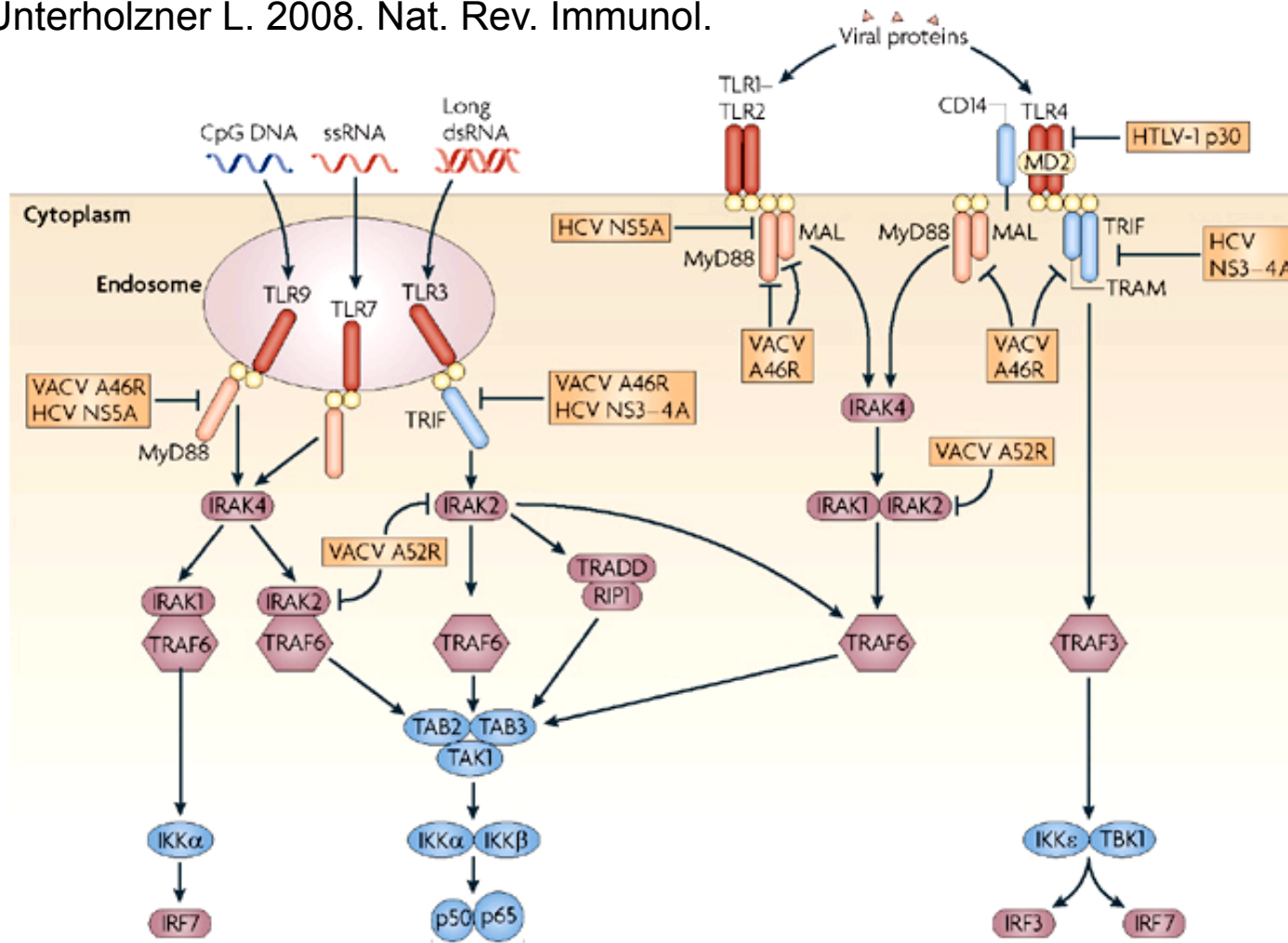
Stratégies similaires concernant Ly49, NCR-1

Engagement direct des cellules NK: le virus Influenza infecte les cellules NK par un processus d'entrée clathrine / cavéoline-dépendant et en cause l'apoptose *in vitro* (Mao H et coll. 2009. J. Virol.) ET *in vivo* (Guo H et coll. 2009. Immunol. Cell Biol.).

3 - Les virus antagonisent les réponses immunitaires innées: stratégies anti-PRR

Evasion virale de la voie de signalisation TLR

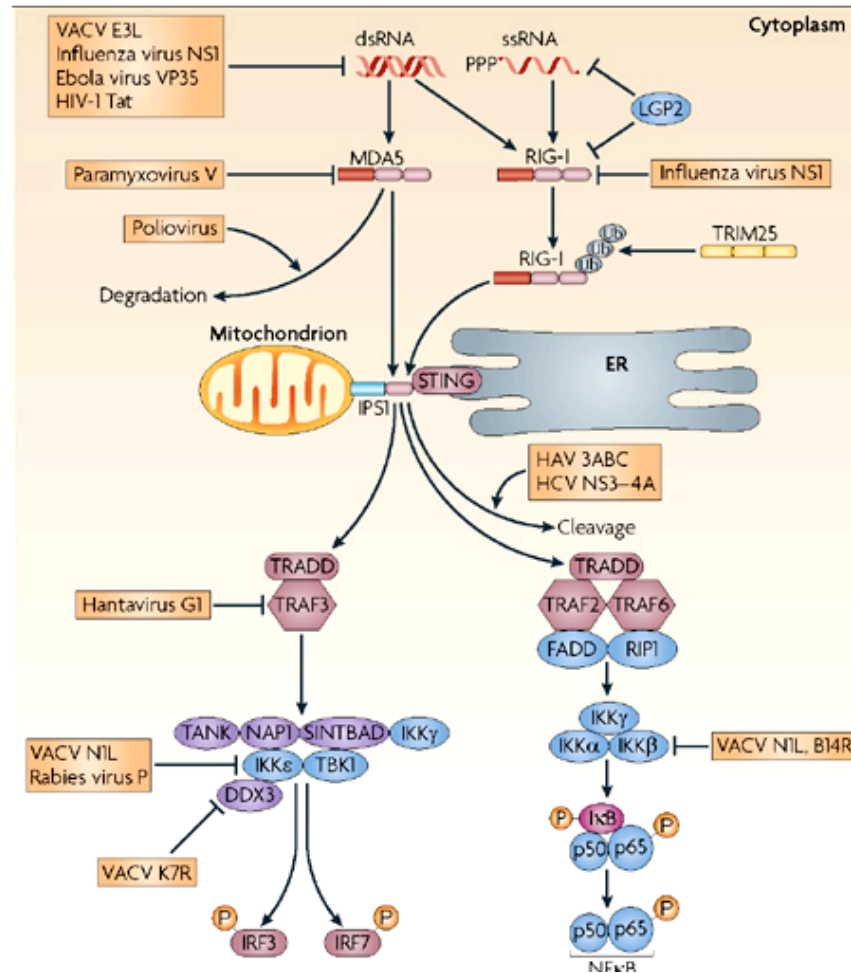
Bowie A & Unterholzner L. 2008. Nat. Rev. Immunol.



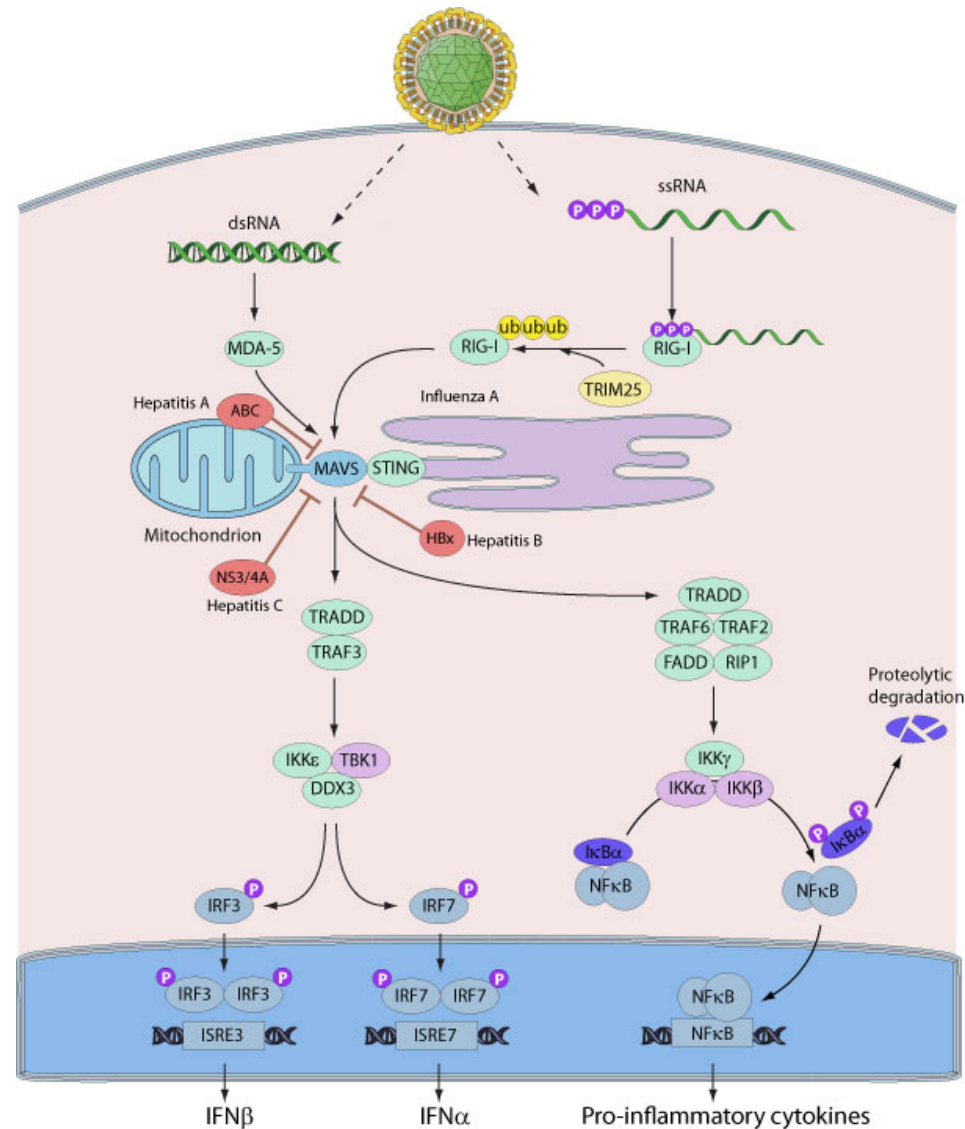
The vaccinia virus (VACV) protein A46R sequesters all these adaptor proteins, whereas the hepatitis C virus (HCV) protein NS5A selectively binds MyD88 and the HCV NS3-4A protease cleaves TRIF. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) protein p30 acts even further upstream by reducing the expression of TLR4. VACV A52R binds to and inhibits IRAK2, thereby affecting several TLR pathways that lead to nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation. dsRNA, double-stranded RNA; IFN, interferon; IL-1R, interleukin-1 receptor; IRF, IFN-regulatory factor; I- κ B, inhibitor of NF- κ B; MD2, myeloid differentiation protein 2; ssRNA, single-stranded RNA; RIP1, receptor-interacting protein 1; TAB, TAK1-binding protein; TAK1, transforming-growth-factor- β -activated kinase 1; TANK, TRAF-family-member-associated NF- κ B activator; TIR, TLR/IL-1R; TNFR, tumour-necrosis factor receptor; TRADD, TNFR-associated via death domain.

Evasion virale de la voie de signalisation Rig-1 & MDA (RLR)

Bowie A & Unterholzner L. 2008. Nat. Rev. Immunol.



RLR signalling is inhibited by viral proteins that either bind RIG-I, MDA5 or IPS1 directly or cause their degradation. The I κ B kinase (IKK) family members are also a common target for viral proteins. DDX3, DEAD-box protein 3; dsRNA, double-stranded RNA; FADD, FAS-associated via death domain; HAV, hepatitis A virus; HCV, hepatitis C virus; IFN, interferon; I κ B, inhibitor of NF κ B; LGP2, laboratory of genetics and physiology 2; NAP1, NF κ B-activatingkinase-associatedprotein1; NS1, nonstructuralprotein1; PPP, 5' triphosphate; RIP1, receptor-interacting protein 1; SINTBAD, similar to NAP1 TBK1 adaptor; ssRNA, single-stranded RNA; TANK, TRAF-family-member-associated NF κ B activator; TBK1, TANK-binding kinase 1; TNFR, tumour-necrosis factor receptor; TRADD, TNFR-associated via death domain; TRAF, TNFR-associated factor; TRIM25, tripartite motif-containing 25; ub, ubiquitin; VACV, vaccinia virus.



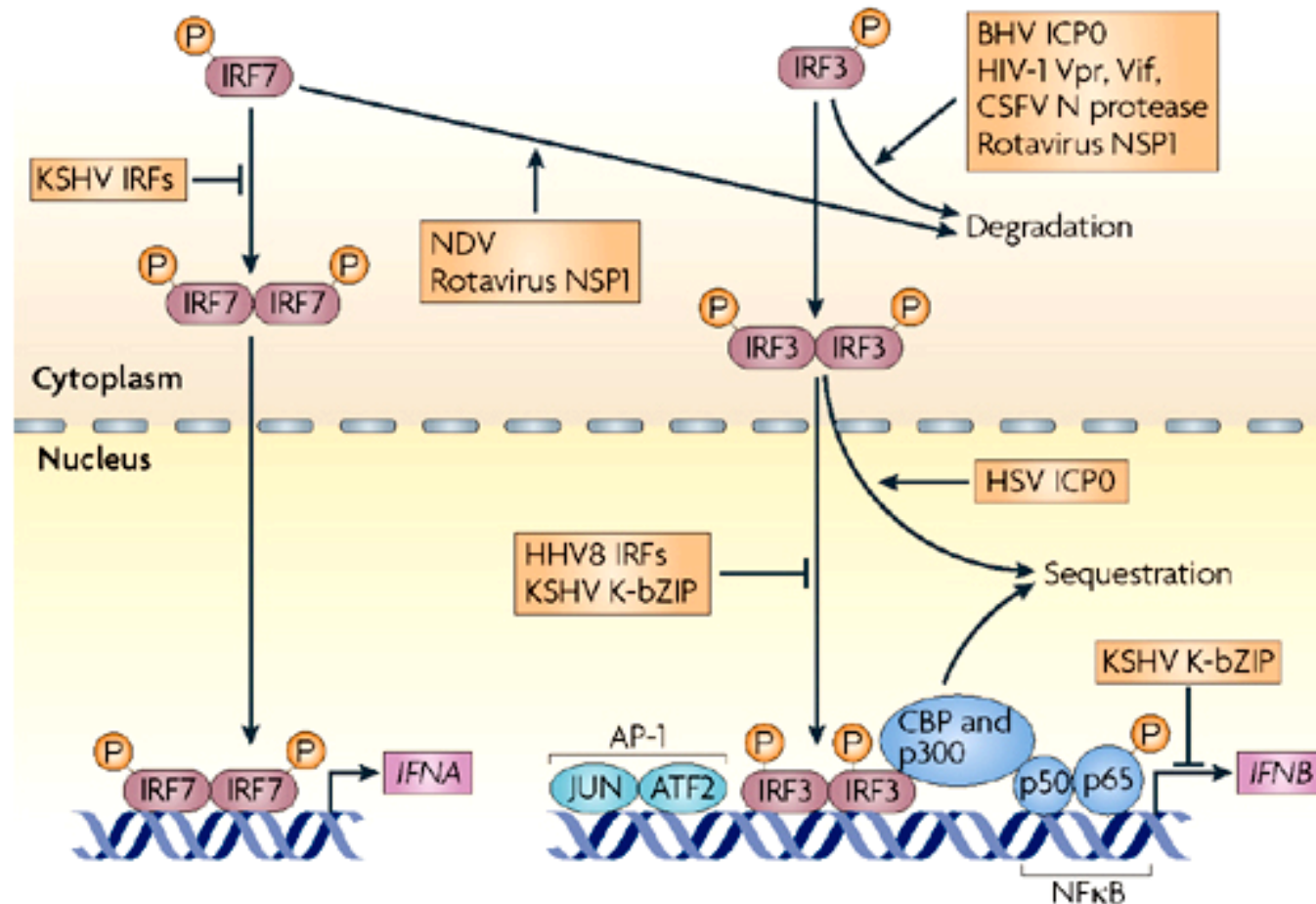
Certains virus inhibent MAVS de manière sélective.

HCV code une sérine protéase (NS3/4A) qui clive le domaine transmembranaire de MAVS, l'empêchant de se fixer sur la mitochondrie.

HAV code la protéine ABC qui se localise à la mitochondrie et inhibe la signalisation par MAVS par clivage protéolytique.

Inhibition de IRF3 et IRF7 par des protéines virales

Bowie A & Unterholzner L. 2008. Nat. Rev. Immunol.



IRF3 and IRF7 are activated by phosphorylation, they then homodimerize and translocate to the nucleus, where they interact with their co-activators CREB-binding protein and NF- κ B. Viruses inhibit IRFs by inducing their degradation, sequestering them or competing with them for binding to promoter sequences. AP1, activator protein 1; ATF2, activating transcription factor 2; BHV, bovine herpesvirus; CREB, cyclic-AMP- responsive-element-binding protein; CSFV, classical swine fever virus; HHV, human herpesvirus; HSV, herpes simplex virus; ICP0, infected cell protein 0; NDV, Newcastle disease virus; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NSP1, non-structural protein 1; KSHV, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.

Leçons apprises sur la biologie des PRR grâce aux virus

Virus de la Vaccine (VV): la protéine **A52R** bloque l'activation TLR-dépendante de la voie NF- κ B en interagissant avec la protéine Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase-2 (IRAK-2). Protéine antérieurement considérée comme redondante. A52R a clairement démontré son rôle essentiel dans cette voie de signalisation (Keating SE et coll. 2007. J. Biol. Chem.). Confirmé secondairement par le déficit de signalisation observé chez une souris IRAK-2 KO (Kawagoe T et coll. 2008. Nat. Immunol.): signalisation séquentielle IRAK-1-IRAK-2.

La protéine **K7R** du VV cible la DEAD-box protéine-3 (DDX3) et bloque la signalisation menant à l'expression de IFN-beta. Cette interaction a permis de reconnaître DDX3 comme un élément clé de la signalisation PRR-dépendante activant l'expression des "IFN-regulatory factors" (IRF). Reconnaissance du rôle clé du complexe DDX3 - TANK-binding Kinase-1 (TBK1) - IKK-omega (Schroder M et coll. 2008. EMBO J.)

Virus Influenza: rôle de l'étude de l'effet inhibiteur de la signalisation RIG-1 dépendante par la protéine virale **NS1** montrant que l'agoniste de RIG-1 était ssRNA et non dsRNA (Pichlmair A et coll. 2006. Science & Hornung V et coll. 2006. Science).

4 - Les virus antagonisent les réponses immunitaires innées: stratégies anti-IFN

Les Interférons de Type I (IFN) sont de petites glycoprotéines qui jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la réponse innée à une infection virale. Ce sont tous les IFN (alpha, beta, omega chez l'homme) qui se lient à l'IFN-alpha récepteur (IFNAR).

Les IFN de Type I sont produits par de nombreuses cellules, pas uniquement immunitaires. Les leucocytes sont les grands pourvoyeurs d'IFN-alpha. Les fibroblastes et surtout les DC plasmocytoïdes sont les grands pourvoyeurs d'INF-beta (1000x) (Liu YJ. 2005. Ann. Rev. Immunol.)

Quasiment tous les virus ont développé des stratégies permettant la subversion de l'induction, de la signalisation, ou du mode d'action anti-viral de IFN.

Plus de 170 effecteurs antagonistes identifiés parmi 93 virus différents !
Certains virus expriment donc plusieurs stratégies anti-IFN.

Quatre stratégies anti-IFN principales sont employées:

- 1 – Inhibition de la transcription des gènes cellulaires
- 2 – Séquestration de molécules dans le circuit de signalisation
- 3 – Clivage protéolytique d'effecteurs clés
- 4 – Dégradation par le protéasome de composés clés du circuit de signalisation

Le "circuit" de l'IFN de Type I

1 – Reconnaissance des PAMPs

Grande complexité des voies de signalisation activant l'expression des gènes *IFN*

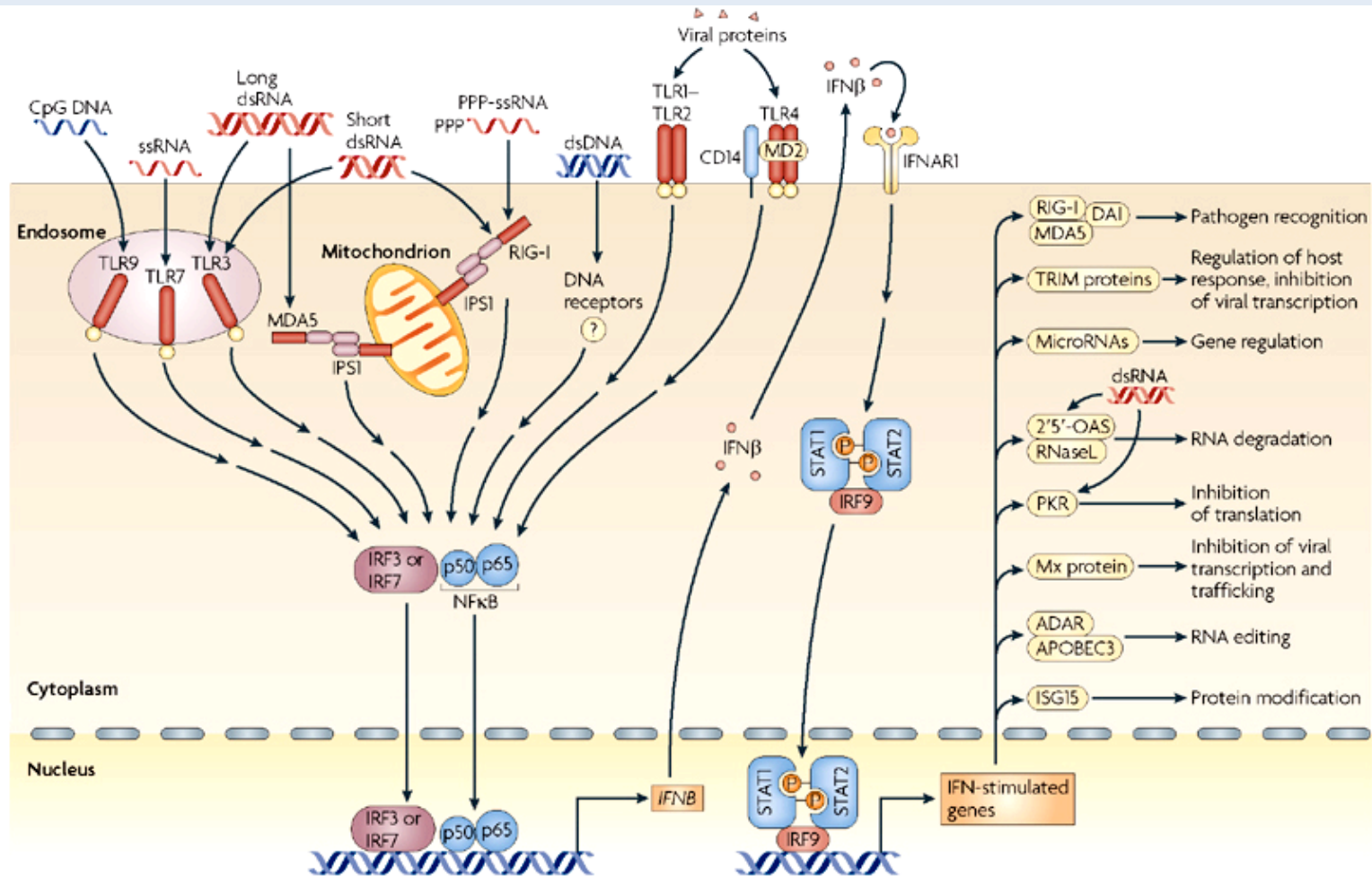
2 – Synthèse et sécrétion IFN de Type I

3 – Liaison au récepteur IFNAR (autocrine / paracrine)

4 – Induction transcritioionnelle de centaines de gènes (IFN-stimulated genes)

Chaque étape est une cible pour l'inactivation par un ou plusieurs virus

Activation des réponses immunitaires innées de type IFN en réponse à l'engagement des cellules de l'hôte par des virus



Piratage du système d'ubiquitination de l'hôte pour assurer l'évasion virale de la réponse IFN de Type I

Le système Ubiquitination-Protéasome Dégradation (UPS) est largement "piraté" par les virus afin d'effectuer les modifications post-traductionnelles qui vont assurer la subversion des voies de signalisation de la défense cellulaire.

Il s'agit le plus souvent d'un détournement des enzymes d'ubiquitination cellulaire, mais certains virus peuvent exprimer leurs propres effecteurs (KSHV, K3/5 = E2). Au delà de l'ubiquitine, des "ubiquitine-like modifiers" (ULM) sont aussi utilisés: SUMO, ISG15, ATG6.

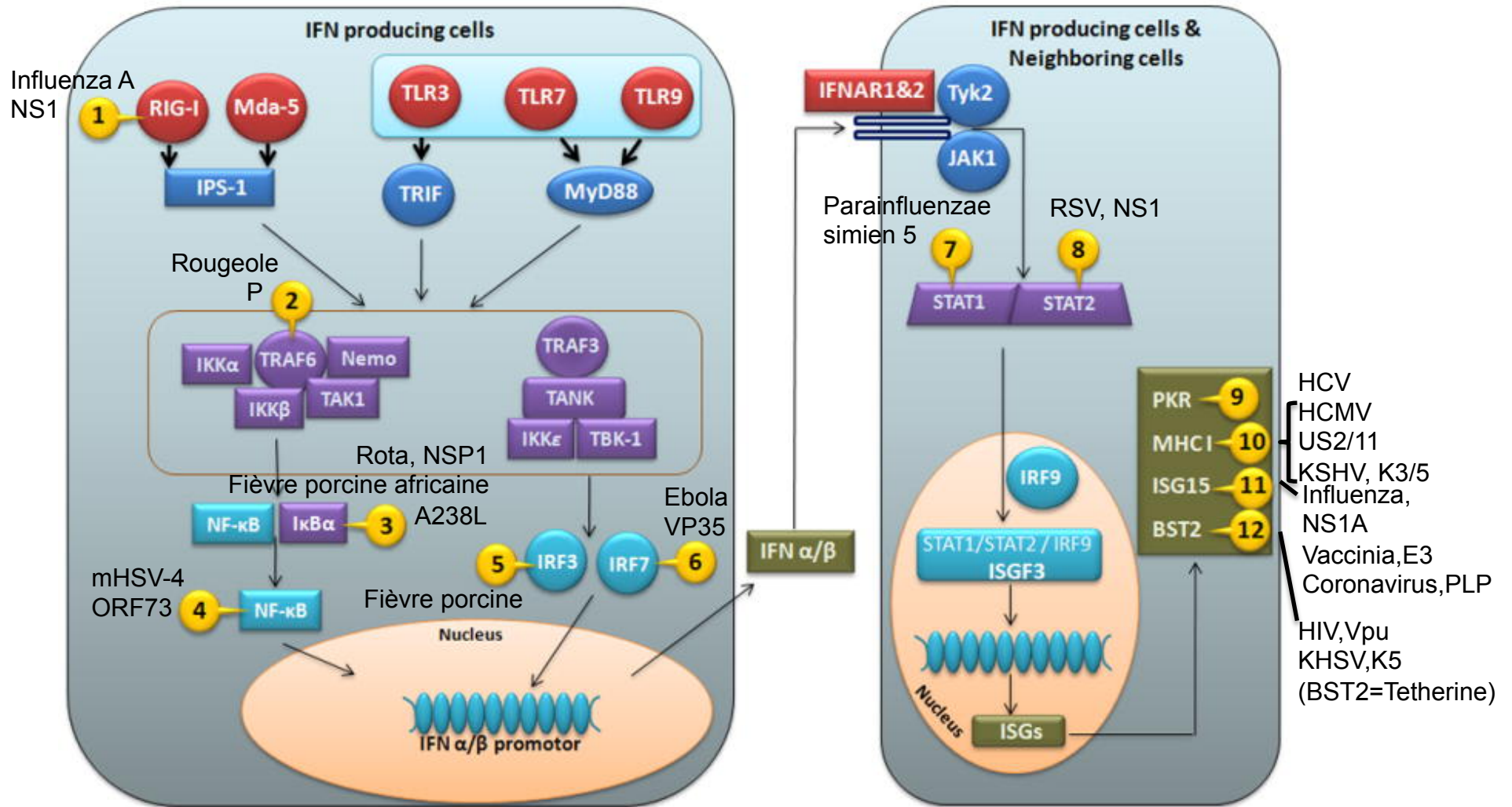
Toutes les étapes du cycle de l'IFN de Type I sont concernées:

Inhibition de l'activation d'IRF3

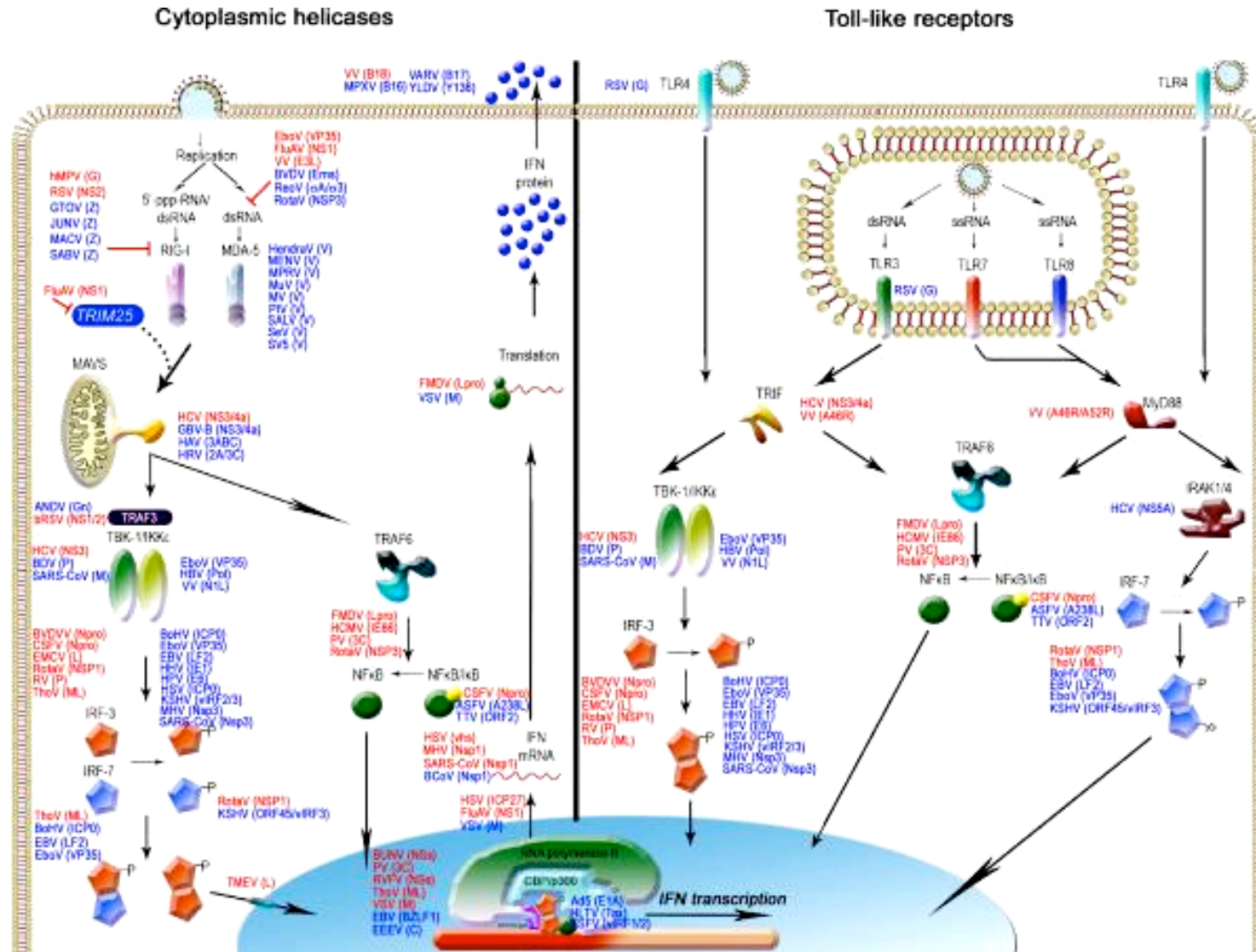
Inhibition des signaux transduits en présence d'IFN de Type I

Inhibition des fonctions de gènes induits par l'IFN Type I

Piratage du système d'ubiquitination de l'hôte pour assurer l'évasion virale de la réponse IFN de Type I



Induction des IFN de Type 1 par les TLR et les RLR & antagonistes viraux



Red = proof by mutant virus
 Blue = proof by overexpression

Versteeg GA & Garcia-Sastre A. 2010. Curr. Opin. Microbiol.

Antagonistes viraux de l'IFN de type I: *in vivo veritas*

Le nombre très importants d'antagonistes identifiés de l'IFN de type I repose essentiellement sur des études *in vitro*.

Peu d'études ont été réalisées *in vivo* à l'aide, en particulier, de souches virales mutantes.

Lorsqu'elles l'ont été, les résultats ont en général confirmé les données *in vitro*:

Recombinant Ebola (Prins KC et coll. 2010. J. Virol) et

SARS-CoV dépourvu des effecteurs antagonistes de l'IFN
(Kamitani W et coll. 2009. Nat. Struct. Mol. Biol.)

5 - Modulation par les virus des fonctions des cellules dendritiques

Les virus manipulent les fonctions des cellules dendritiques (DC) afin d'assurer entrée, réplication, dissémination et transmission.

- Le trafic des virus dans les DC altère les voies de trafic cellulaire (leçon#4).

- L'infection virale altère les mécanismes de réponse innée des DC (voir 3).

- L'infection virale des DC altère la présentation des antigènes exogènes restreinte par les molécules du CMH de Classe II.



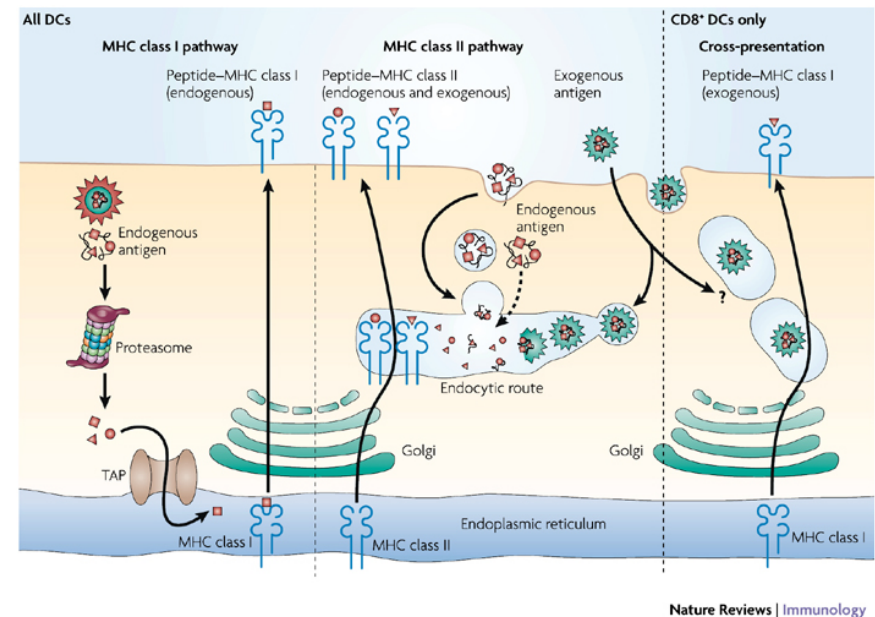
Inhibition de la présentation des antigènes par le MHC de Classe II

Les pathogènes / virus entrent dans la voie d'endocytose par phagocytose ou endocytose médiée par récepteur. Au sein des endosomes les protéines étrangères sont dégradées en peptides antigéniques par les protéases endosomales.

Dans le ER, le dimère alpha-beta du MHC de Classe II s'associe étroitement avec la chaîne invariante qui prévient l'association des peptides endogènes avec les molécules de Classe II dans le ER.

La fusion de l'endosome avec la vésicule d'exocytose résulte en le clivage de la chaîne invariante et l'échange avec un Peptide antigénique.

Le chargement du peptide stabilise la molécule de Classe II qui peut migrer vers la surface cellulaire.



Inhibition par les virus de la présentation des antigènes médiée par le MHC de Classe II

Inhibition de l'expression à la surface cellulaire des antigènes de Classe II

HCMV: US2 affecte l'expression des antigènes de Classe I, mais entraîne aussi la translocation des antigènes de Classe II DR-alpha et DM-alpha dans le cytosol pour dégradation par le protéasome (Boname TR et coll. 1999. Nat. Med.).

EBV code une molécule transmembranaire de 42 kDa qui interfère avec la présentation antigénique par les CMH II. Bases moléculaires inconnues.

Interférence avec la voie d'endocytose

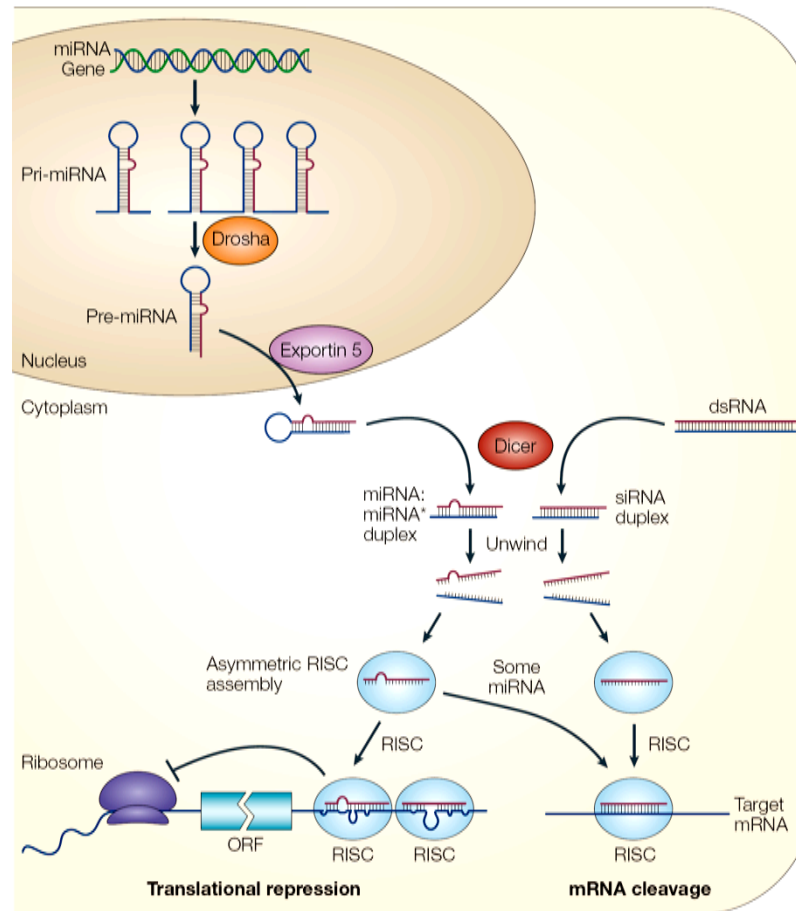
HPV: l'oncoprotéine E5 influence l'acidification des endosomes, donc l'épissage des antigènes (Straight SW et coll. 1995. J. Virol.)

Inhibition de l'expression des molécules du MHC de Classe II par l'IFN

Adénovirus: la protéine E1A inhibe directement la signalisation qui mène à l'induction de l'expression des molécules MHC II par les IFN-alpha et beta au niveau de leurs récepteurs (Kalvakolanu DV et Coll. 1991. PNAS).

HCMV: même effet de certaines protéines "immediate-early" et "early" que E1A d'Adénovirus

6 - Nouveaux concepts dans les stratégies de contrôle de l'immunité par les virus: les MicroARN



RISC = RNA-inducing silencing complex

Les MicroARN (miARN) sont de petits ARN endogènes d'environ 23 nucléotides qui jouent un rôle maintenant reconnu comme essentiel dans la régulation de l'expression génique chez les animaux et chez les plantes en s'appariant à l'ARNm de gènes codant des protéines afin d'assurer leur répression post-transcriptionnelle.

Identification of Virus-Encoded MicroRNAs

Sébastien Pfeffer,¹ Mihaela Zavolan,² Friedrich A. Grässer,³
Minchen Chien,⁴ James J. Russo,⁴ Jingyue Ju,⁴ Bino John,⁵
Anton J. Enright,⁵ Debora Marks,⁴ Chris Sander,⁵ Thomas Tuschl^{1*}

RNA silencing processes are guided by small RNAs that are derived from double-stranded RNA. To probe for function of RNA silencing during infection of human cells by a DNA virus, we recorded the small RNA profile of cells infected by Epstein-Barr virus (EBV). We show that EBV expresses several microRNA (miRNA) genes. Given that miRNAs function in RNA silencing pathways either by targeting messenger RNAs for degradation or by repressing translation, we identified viral regulators of host and/or viral gene expression.

30 APRIL 2004 VOL 304 SCIENCE

Base de donnée/registre des miARN: <http://www.mirbase.org>

Environ 200 miARN viraux répertoriés

Immense majorité = virus ADN se répliquant dans le noyau (Herpesvirus alpha, beta, gamma et polyomavirus)

HSV1: 7 miARN

EBV: 35 miARN

Polyomavirus: 2 miARN

(Boss IW. 2009. Trends Microbiol.)

En dépit de recherches intensives par "deep sequencing" des ARN:

Les virus ARN (ex. Influenza, HIV, HCV) et les virus ADN se répliquant dans le cytoplasme (Poxvirus) ne codent pas de miARN !

Raison ?

Reflète leur incapacité d'accéder à Drosha dans le noyau et la nécessité pour les virus ARN de protéger leur génome

De Drosha/Dicer ?

Les miARN sont surtout caractéristiques des Herpesvirus. Lié à la caractéristique de leur cycle impliquant la latence ?

Les miARN viraux: des outils pour l'immuno-évasion, quelques exemples...

Fonctions principales des miARN viraux:

Inhibition de l'immunité à médiation cellulaire

HCMV: miR-UL112-1 réprime l'expression de MICB, un ligand cellulaire (homologue à MHC I = chaîne B) activateur des cellules NK (Stern-Ginossar N et coll. 2007. Science).

Ciblage des inducteurs de l'apoptose et des régulateurs du cycle cellulaire

KSHV: miR-K12-1, -K12-3-3p, -K12-6-3P inhibent l'expression de deux suppresseurs de tumeur qui régulent le cycle cellulaire (Thrombospondin-1 et p21) (Samols MA et coll. 2007. PLoS Pathog.).

Rôle dans la latence

Les Herpesvirus **persistent** chez leurs hôtes toute la vie. Ils doivent donc en permanence échapper aux mécanismes d'immuno-surveillance. Stratégie commune la **latence**. Le maintien de la latence nécessite la suppression de l'expression des produits des gènes responsables du "switch" latence-cycle lytique.

HCMV: miR-UL112-1 réprime l'expression de IE72, un gène trans-activateur majeur qui induit le passage latence-cycle lytique (Grey F et coll. 2007. PLoS Pathog.)

Les miARN des virus ADN à réplication intranucléaire régulent les réponses immunitaires de l'hôte

