

# Subversion du cytosquelette cellulaire par les virus

Philippe J. Sansonetti

Leçon #4

Collège de France

19 janvier 2011



## Virus, bactéries: même combat !

Subversion du cytosquelette et des compartiments cellulaires

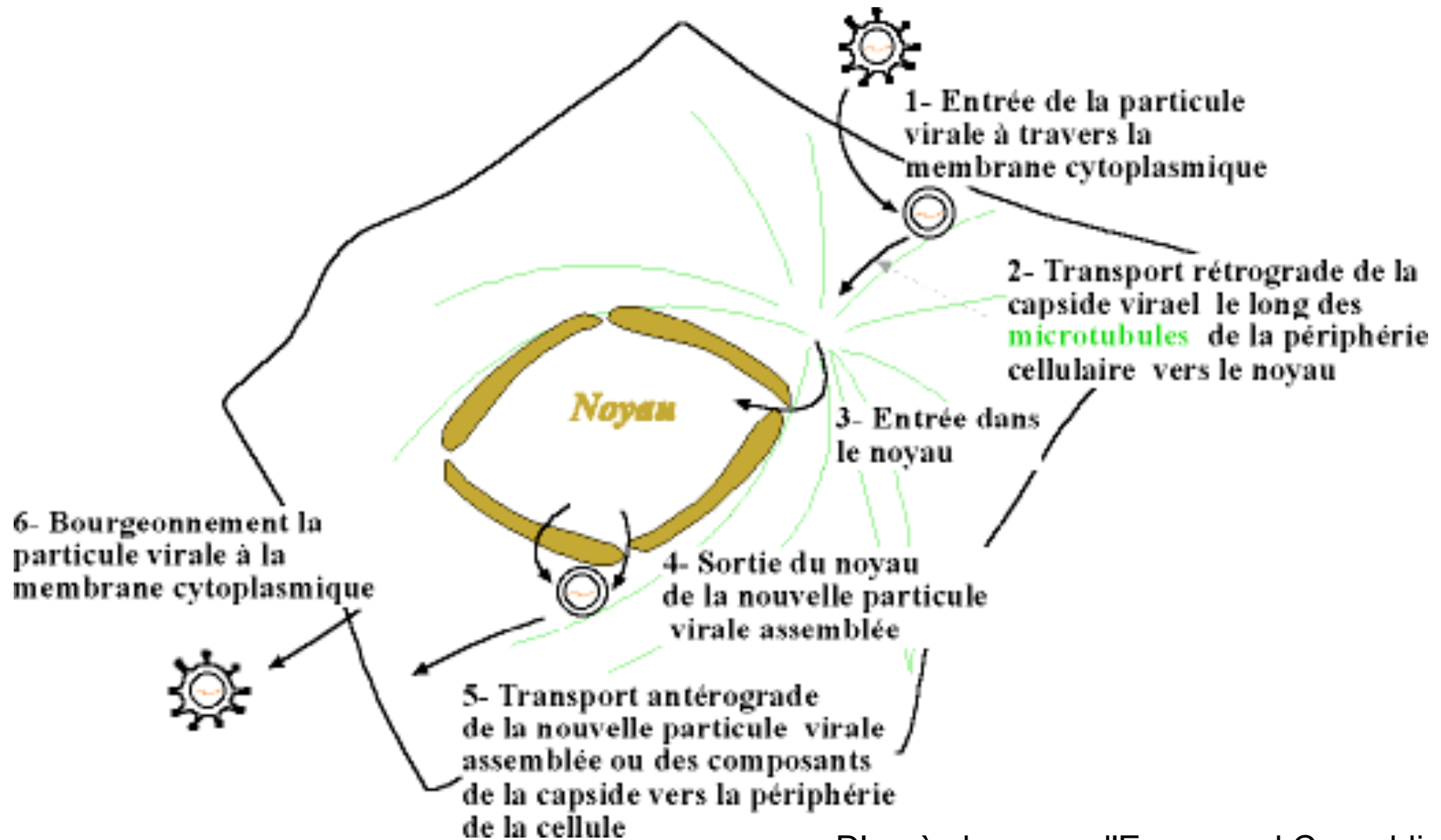
Cytosquelette d'actine

Microtubules

Subversion des mécanismes de vie, de mort et du cycle cellulaire

Subversion des réponses immunitaires des cellules infectées

# Grandes étapes du cycle viral en regard des fonctions du cytosquelette cellulaire



D'après le cours d'Emmanuel Ceccaldi  
Transport viral et altérations viro-induites.  
Institut Pasteur

# Subversion des fonctions du cytosquelette cellulaires par les virus

L'infection virale convertit les fonctions physiologiques de la cellule afin d'optimiser la réplication virale et la production et dissémination des virions.

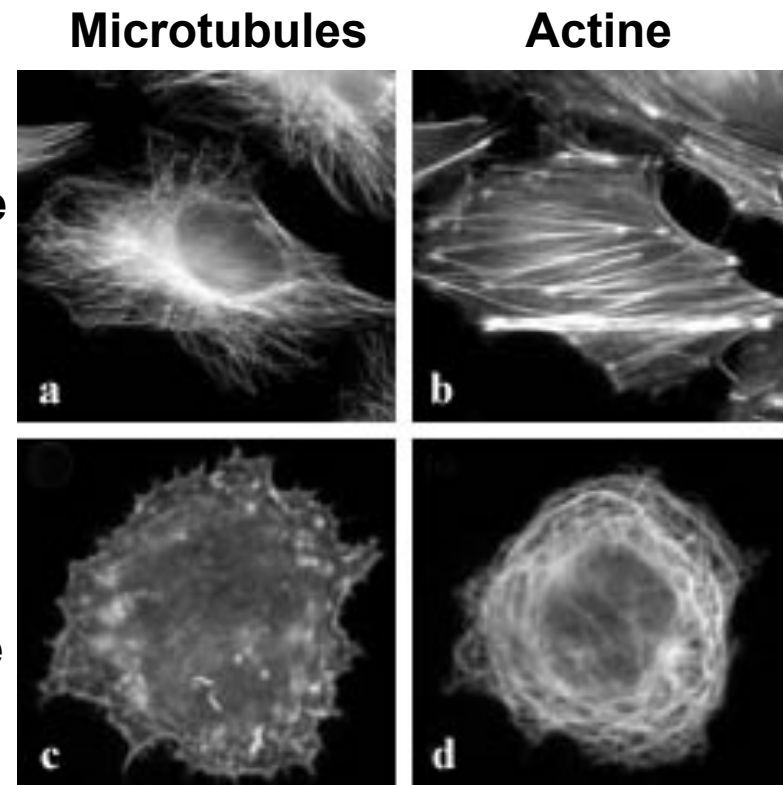
Deux cibles privilégiées:

**L'actine** dont les filaments sont reconfigurés et réorganisés à tous les stades du cycle viral, depuis l'entrée jusqu'à l'assemblage et la sortie de la cellule (Taylor MP et coll. 2011. Nature Rev. Microbiol.).

**Contrôle**

**Virus Vaccine**

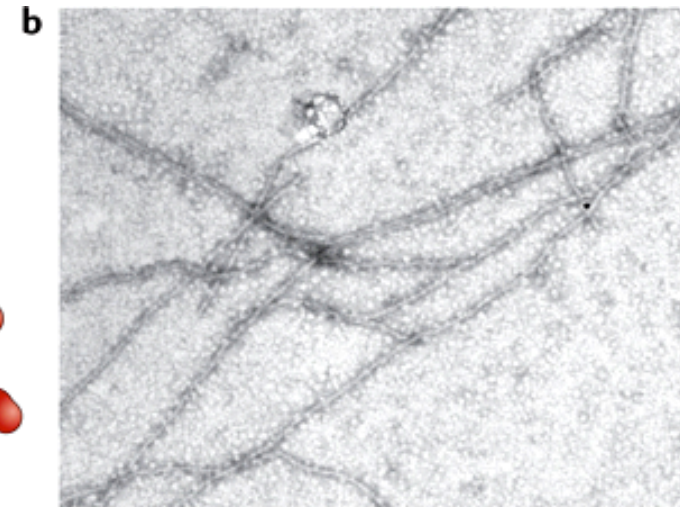
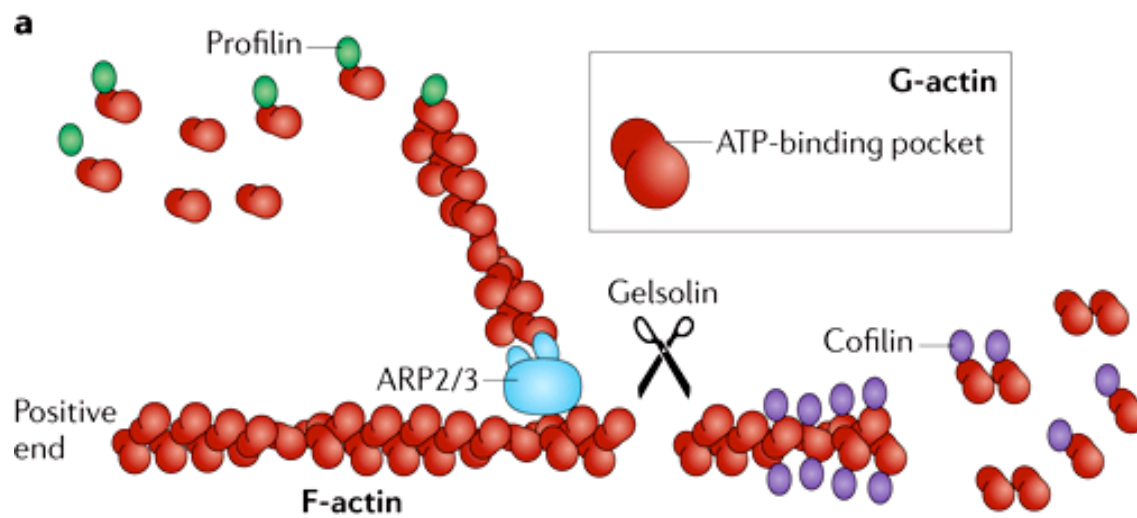
**Les microtubules** utilisés surtout pour la migration des virions ou d'éléments avant assemblage (Hsieh MJ et coll. 2010. Current Opin. Biotechnol.).



D'après E. Ceccaldi

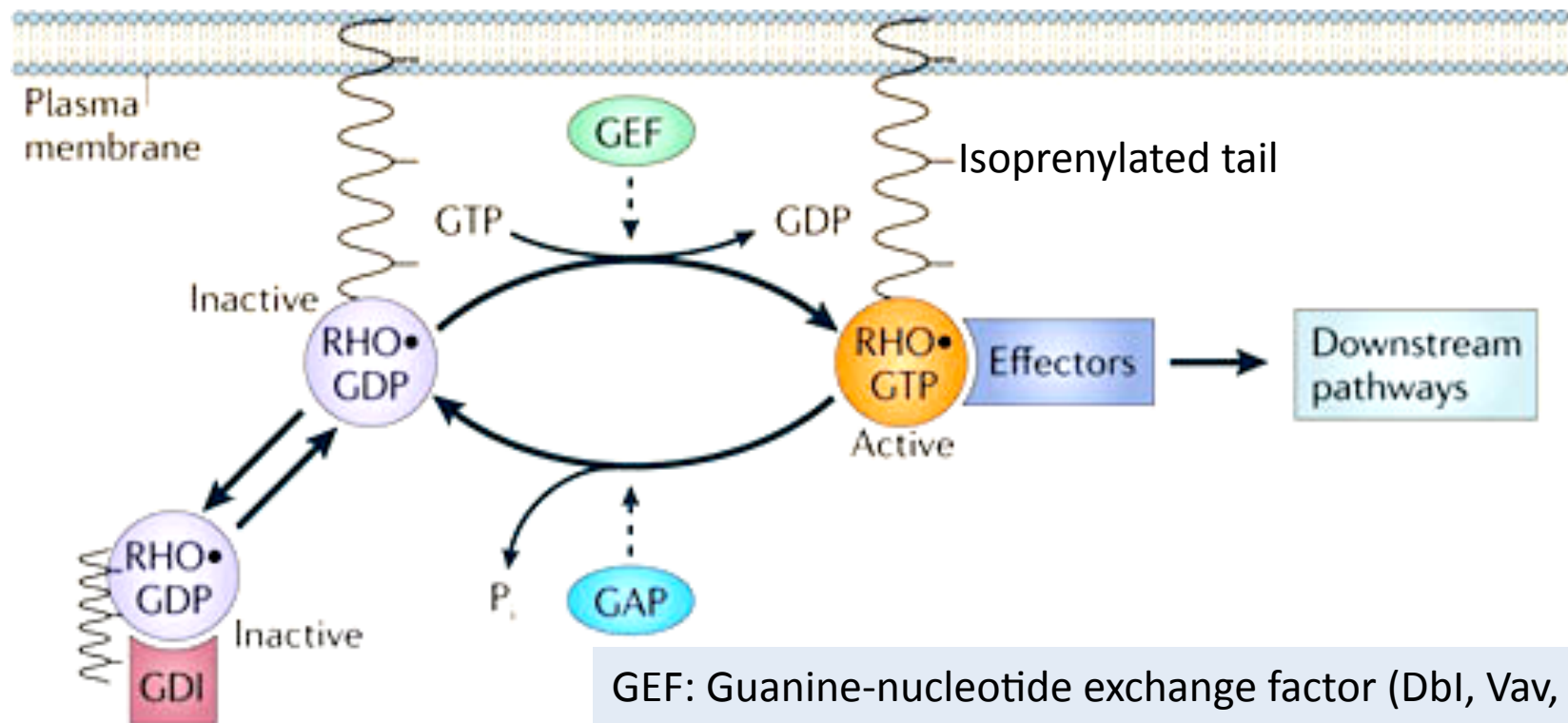


# Interaction virus - cytosquelette d'actine

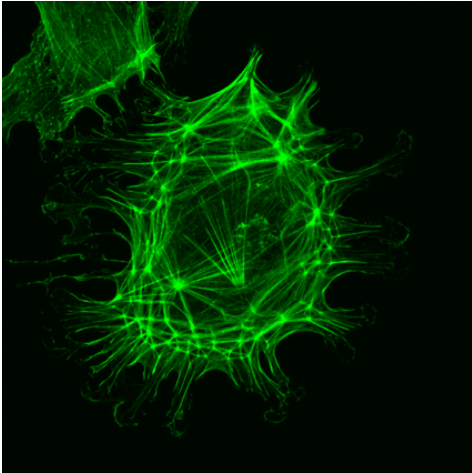


# Les petites GTPases de la famille Rho comme commutateurs moléculaires (« molecular switch ») décidant / contrôlant la nucléation de la polymérisation des filaments d'actine

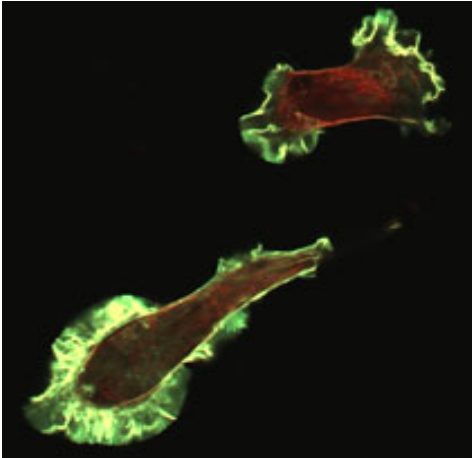
Les petites GTPases cdc42, Rac, Rho dans leur forme active liée au GTP régulent la polymérisation de l'actine, la dynamique du cytosquelette d'actine, l'adhérence cellulaire et l'expression génique



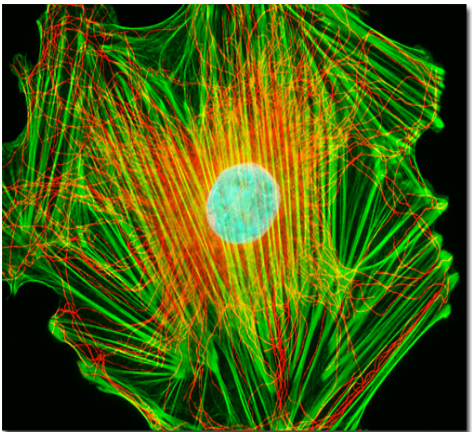
GEF: Guanine-nucleotide exchange factor (Dbl, Vav, Tiam1)  
GAP: GTPase-activating protein (p190 Rho Gap)  
GDI: GDP dissociation inhibitor (Rho GDI)



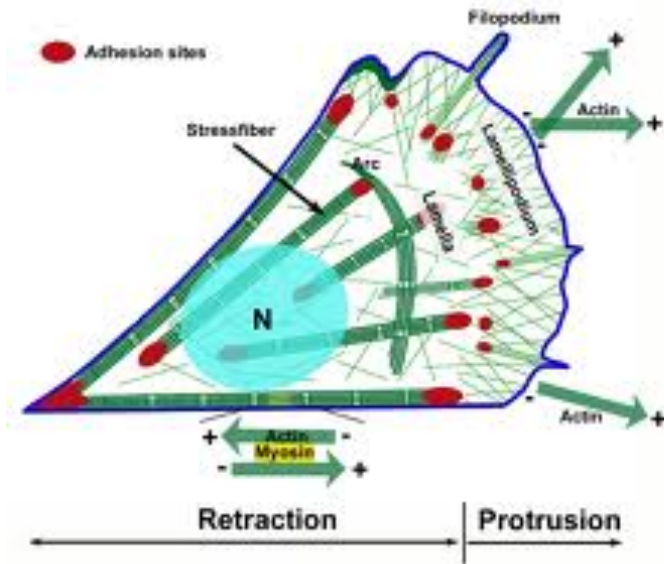
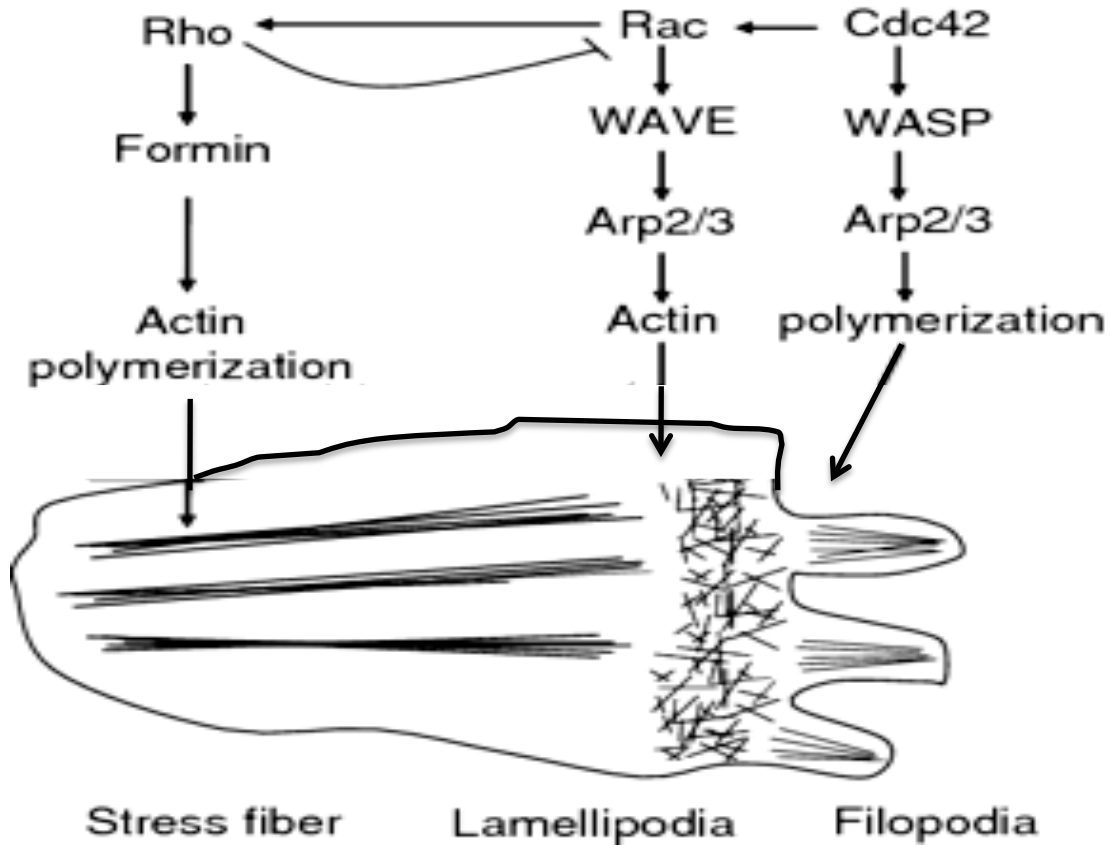
cdc42



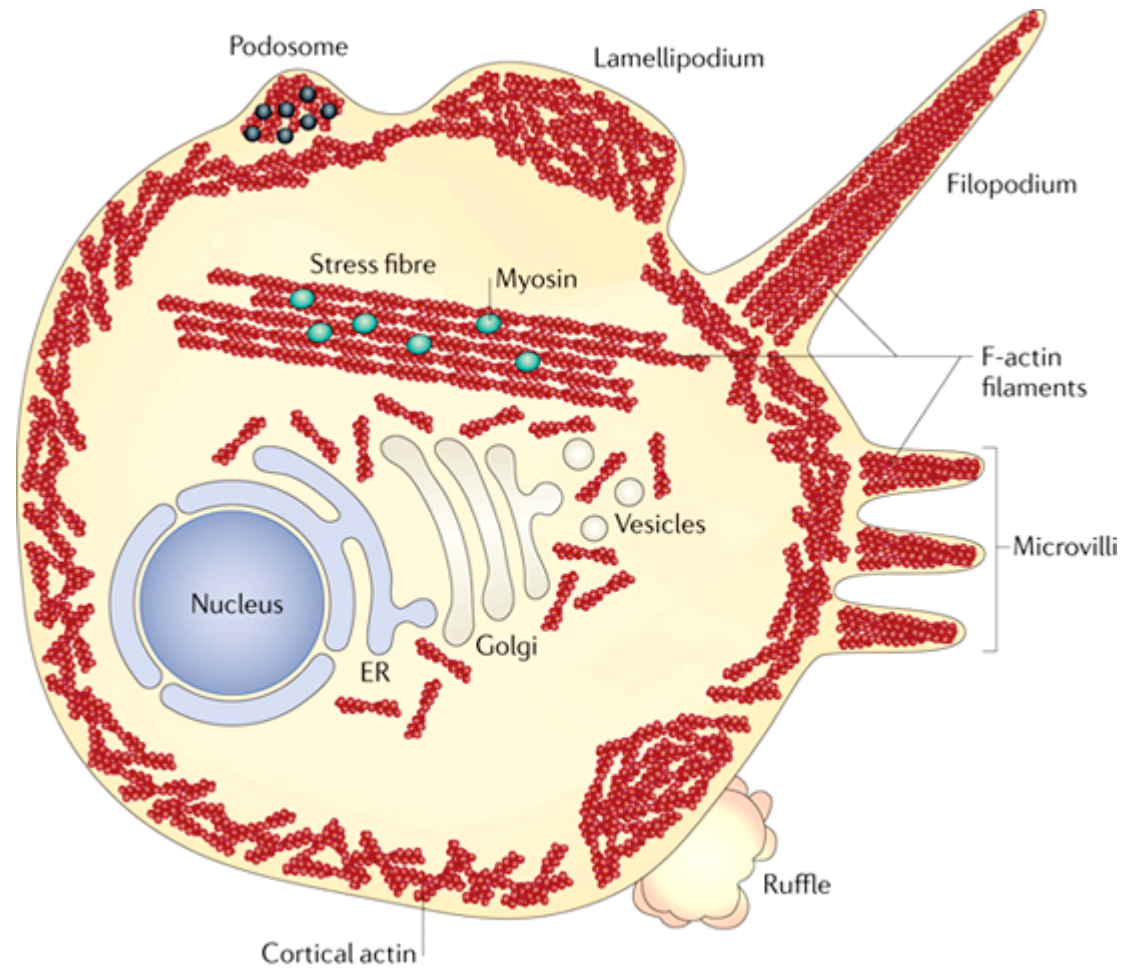
Rac1



RhoA



# Structures cellulaires étayées par l'actine



# Transformation cellulaire par les virus oncogènes

Premier lien entre changement de la morphologie cellulaire et infection virale établi dans les années 70 avec la démonstration de la "transformation cellulaire"

Premier virus transformant identifié: Virus du Sarcome de Rous (RSV) = rétrovirus aviaire (Fleissner E & Tress F. 1973. J. Virol.)

Puis le Simian Virus 40 (SV40) = polyoma virus de singe (McNutt NS et coll. 1973. J. Cell Biol.)

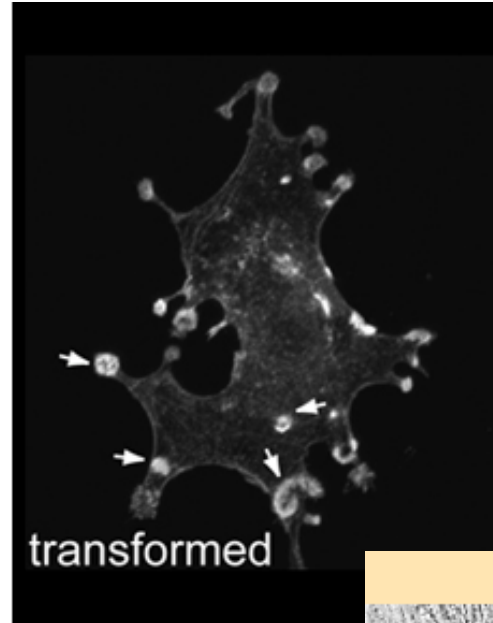
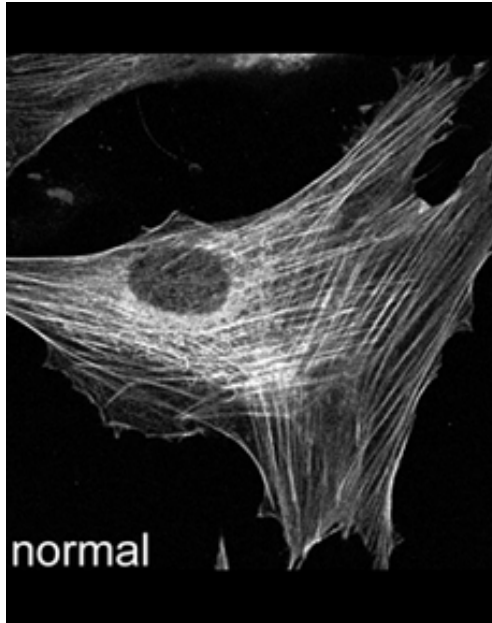
Puis les adenovirus (Goldman RD et al. 1975. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.)

Les changements morphologiques les plus évidents au cours de la transformation sont: l'arrondissement cellulaire, la formation de vésicules mobiles en surface (blebs), l'extension de pseudopodes, la perte de l'inhibition de contact et de fibres de stress.

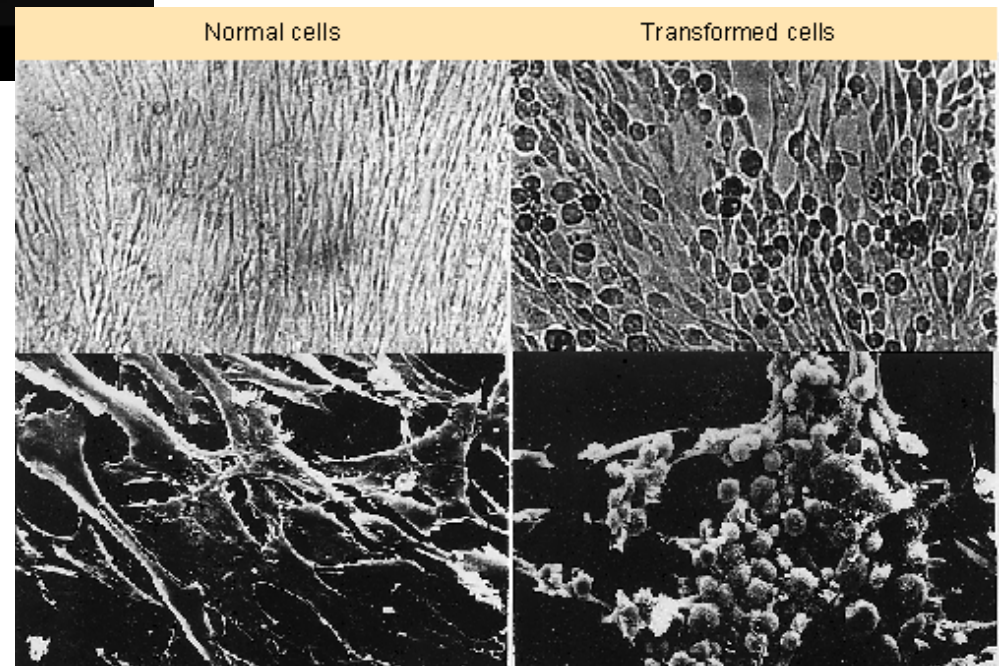
Les cellules transformées sont immobiles, s'agglutinent / s'empilent en culture et ne forment pas de jonctions. Leurs microfilaments sont très altérés.



# Altérations massives de l'architecture et du cytosquelette de cellules transformées



Podosome = structure d'invasion  
(invadopodes)





## Critères de transformation cellulaire

Les modifications morphologiques ne sont que la partie la plus visible d'un processus plus complexe impliquant: prolifération anormale (les cellules *in vitro* ressemblent aux cellules tumorales *in vivo*), dérégulation du cycle cellulaire et inhibition des voies de l'apoptose.

Ces modifications multiples et successives sont dues à l'expression de protéines virales appelées **oncoprotéines**.

Antigènes t et T du virus SV40

(Graessmann A et coll. 1980. J. Virol.)

Protéines E1A & E1B des adénovirus

(Jackson P & Bellett AJ. 1989. J. Virol.)

Protéines E6 & E7 des papillomavirus humains (HPV)

(Charette ST & McCance DJ. 2007. Oncogene)

Rétrovirus dont le génome ARN peut contenir des formes aberrantes de proto-oncogènes cellulaires:

v-Src du RSV = historique (Kellie S et coll. 1991. J. Cell Sci.)

c-src, c-Fos, c-Jun, c-Myc

Les virus transformants sont rarement cytopathiques. Ils immortalisent leurs cellules hôtes, stimulent leur prolifération et s'y répliquent (persistance)

# RSV et la saga de v-Src

RSV est un virus oncogène responsable de tumeurs chez le poulet.  
Il a permis de découvrir la première protéine virale capable de transformation cellulaire (Wang E & Goldberg AE. 1976. PNAS) = v-SRC , ou pp60<sup>v-src</sup> = tyrosine kinase (Kellie S et coll. 1991. J. Cell Sci.)

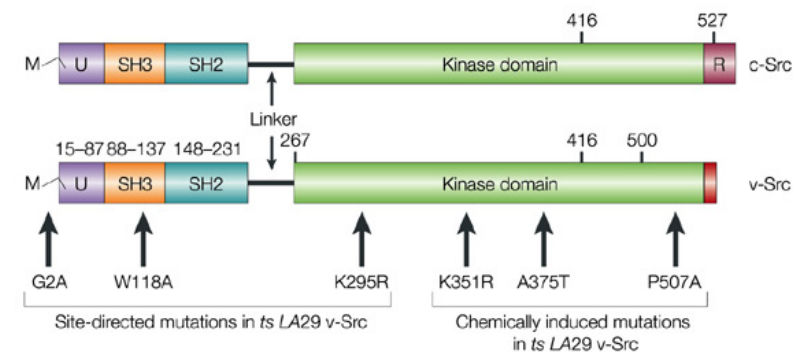
Cible majeure de v-Src = cytosquelette

Survenue séquentielles de modifications:

- Ruffles
- Arrondissement, rétraction du cytoplasme périphérique
- Microvillosités, microprojections, vésicules

v-Src dissout les cables de stress quand microinjecté dans des fibroblastes 3T3

Dans les cellules transformées, v-Src se concentre dans les podosomes (invadopodes), colocalise avec vinculine, taline,  $\alpha$ -actinine, cortactine



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Taylor MP et coll. 2011. Nat. Rev. Microbiol

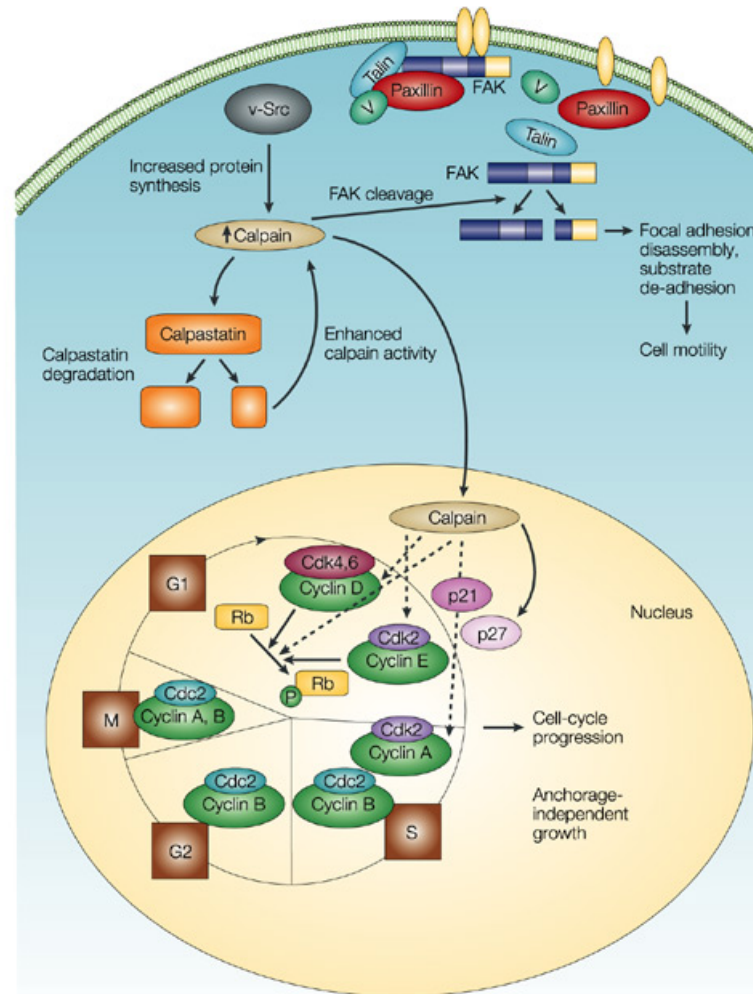
## Calpaïne, cible majeure de v-Src ?

L'activation de v-Src induit la synthèse de la calpaïne qui submerge l'activité inhibitrice de la calpastine et entraîne la protéolyse de la calpastine, donc l'augmentation de l'activité de la calpaïne. Cette activité, dans les cellules transformées par v-Src, entraîne le clivage protéolytique de FAK (Focal Adhesion Kinase), donc le désassemblage des complexes d'adhésion focale. Ceci contribue à une perte d'adhérence et à une acquisition de propriétés de motilité.

L'augmentation de l'activité calpaïne accélère le passage des cellules transformées à travers la phase G1 du cycle, hyperphosphorylation de Rb (Retinoblastoma protein), augmentation de cyclin D, cyclin A et cdk2 (mécanismes ? Clivage de p27 ?)

Calpaïne = lien entre migration et prolifération cellulaire induites par v-Src ?

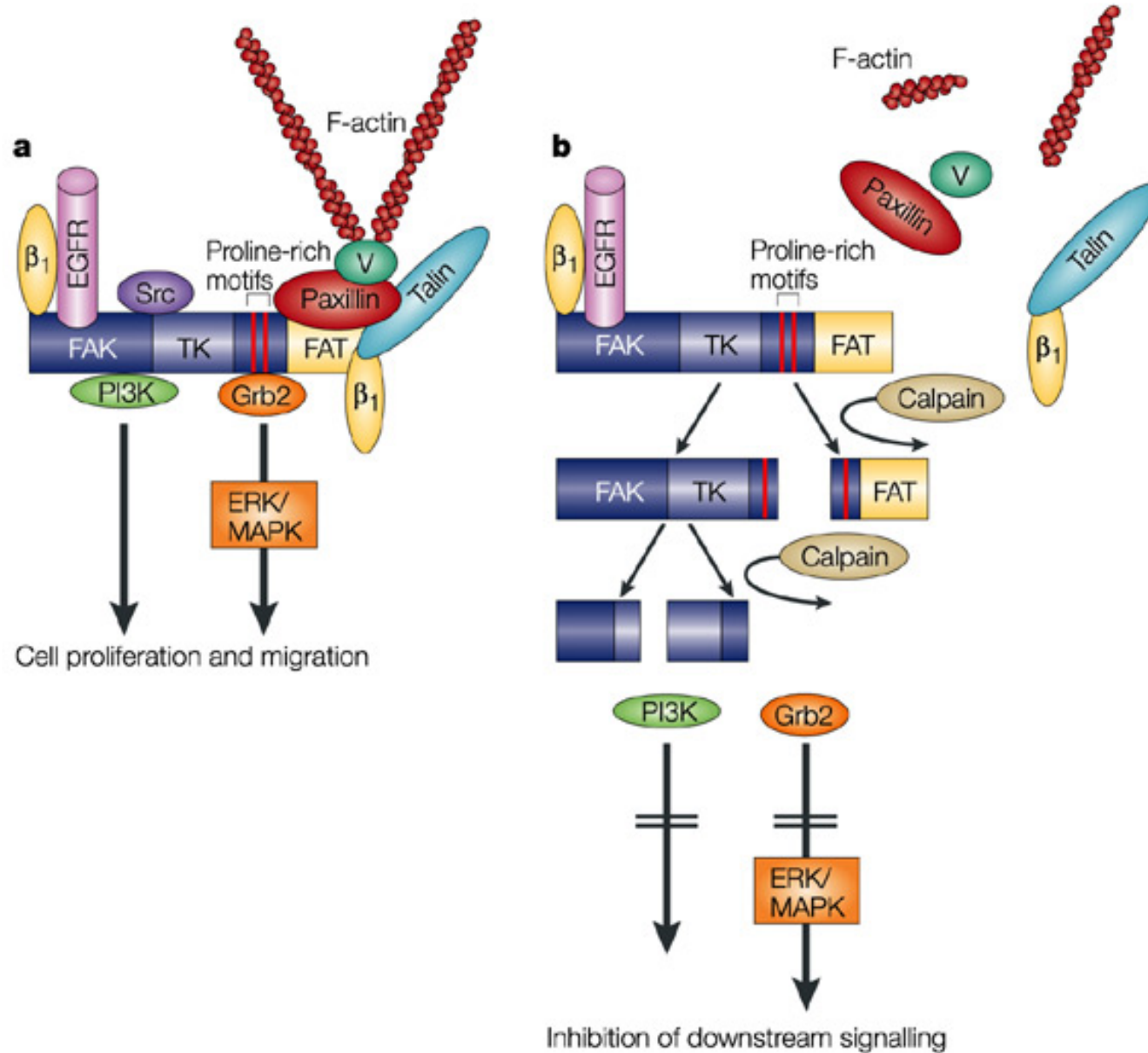
# Calpaïne, cible majeure de v-Src ?



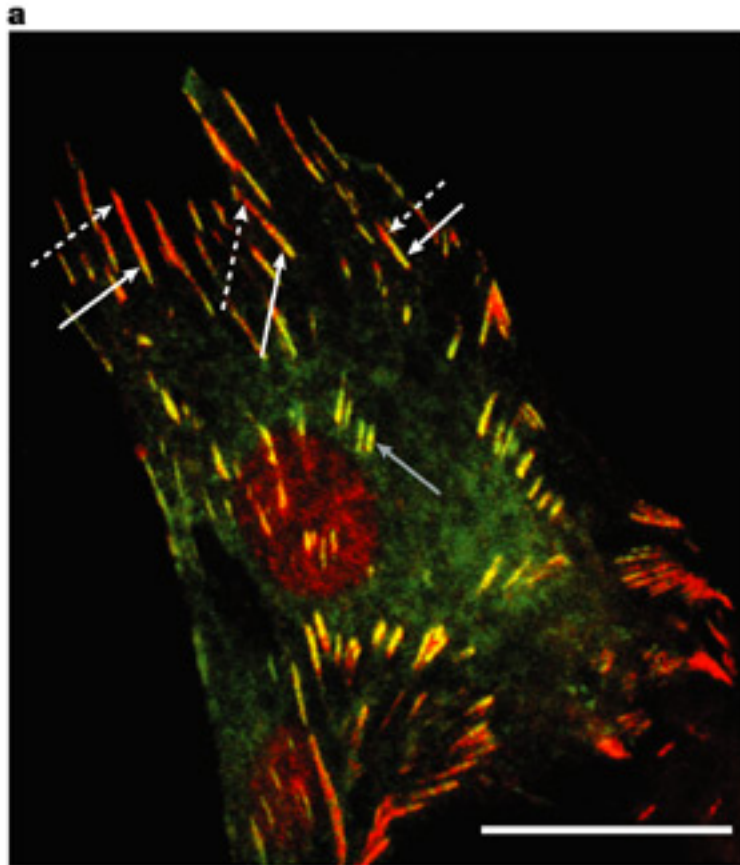
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Frame MC et coll. 2002. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.

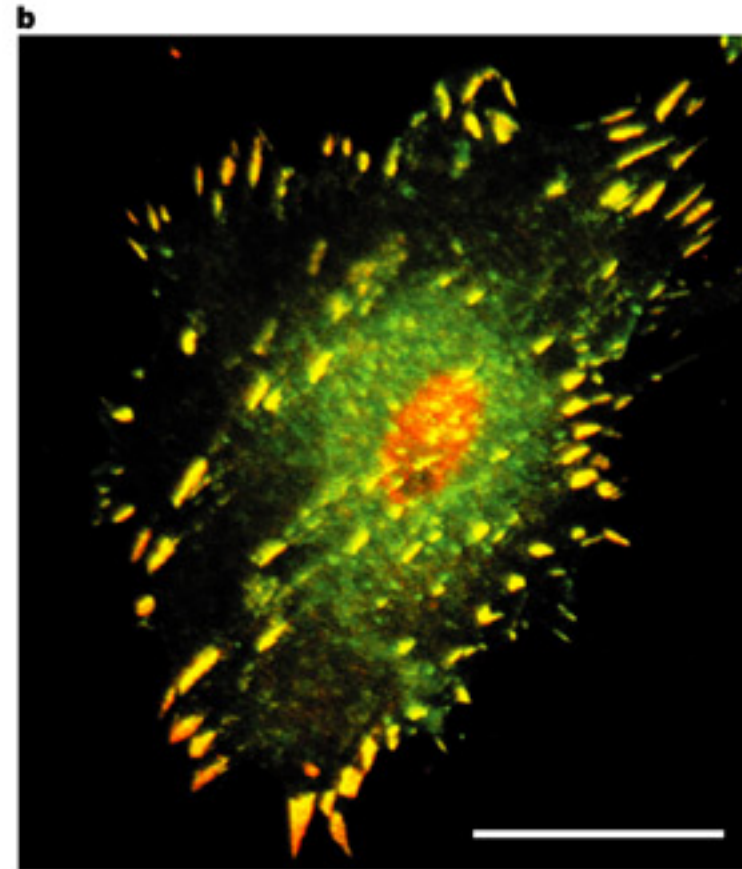
# Calpaïne, cible majeure de v-Src ?



v-Src inactif



v-Src actif



Nature Reviews | Molecular Cell Biology



Frame MC et al. 2002. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.



# Antigène t de SV40

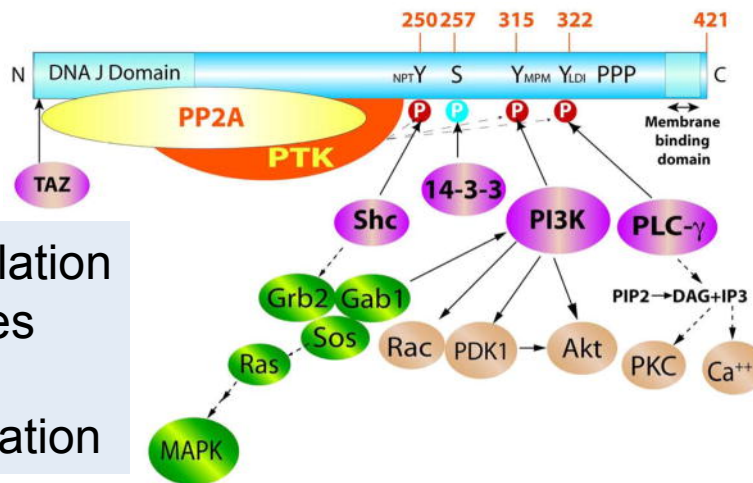
L'antigène t de SV40 engage aussi le cytosquelette d'actine au cours de la transformation cellulaire.

Activation de cdc42 = filopodes

Activation de Rac1 = "ruffles"

Perte d'activité de RhoA = perte des câbles de stress

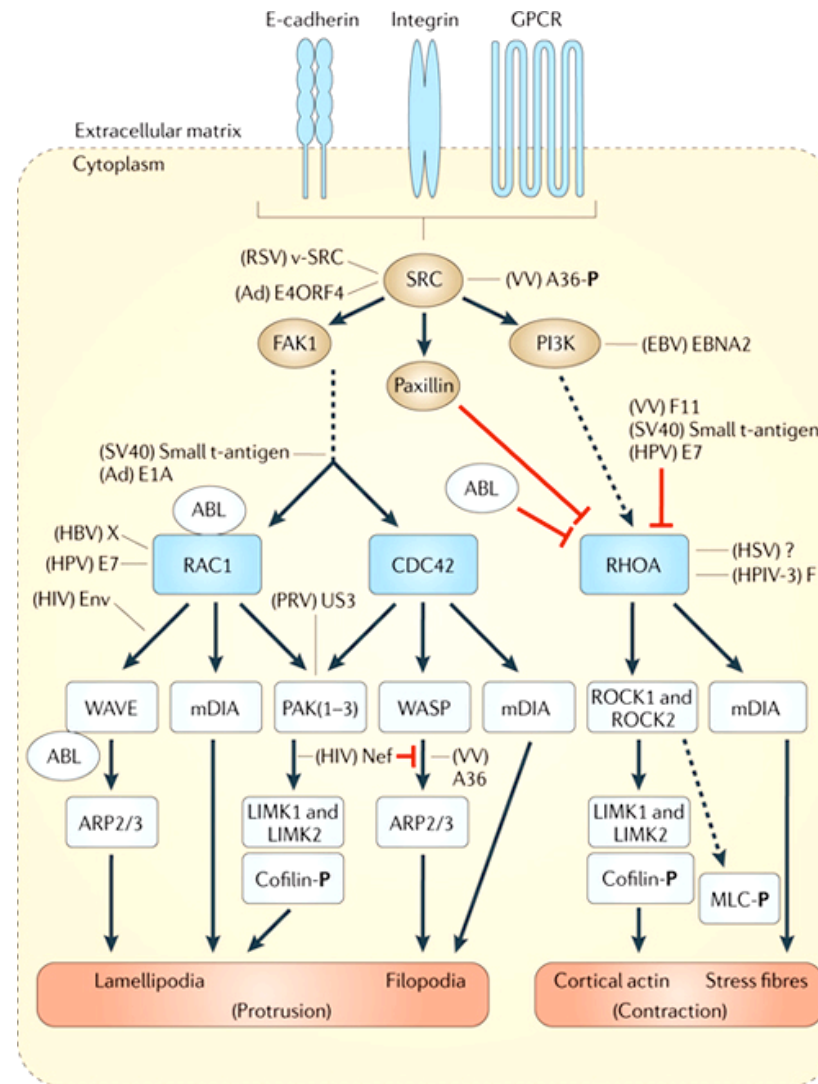
Up régulation des inhibiteurs CIP2Z et SET de la Ser/Thr phosphatase PP2A (Endtner C & Dobner T. 2004. J. Virol) et liaison directe de t avec le "core enzyme" CA.



PP2A au coeur de la régulation de complexes multiprotéiques régulant adhésion, polarité, croissance, survie et prolifération

La transformation cellulaire par EBV, HBV, HPV entraîne aussi des modifications majeures du cytosquelette d'actine (Smalheiser NR. 1996. Mol. Biol. Cell; Arnoys EJ & Wang JL. 2007. Acta Histochem.)

# Contrôle du remodelage du cytosquelette d'actine par les oncoprotéines au cours de la transformation cellulaire



# Rôle de l'actine à tous les stades de l'interaction virus-cellule

## **Actine et entrée du virus**

Contact avec la surface cellulaire, "surfing" du virion

Endocytose du virion

Fusion de la membrane virale (virus enveloppés) et cellulaire

Aggrégation des récepteurs

Induction d'extension cellulaires

# Actine et entrée des virus dans les cellules

Bien que les virus soient de structure et composition "simples", ils engagent des interactions extrêmement complexes avec les cellules dont ils sont totalement dépendants pour leur réplication. Entrer dans les cellules est une exigence vitale. Tout le répertoire des mécanismes d'entrée est utilisé:

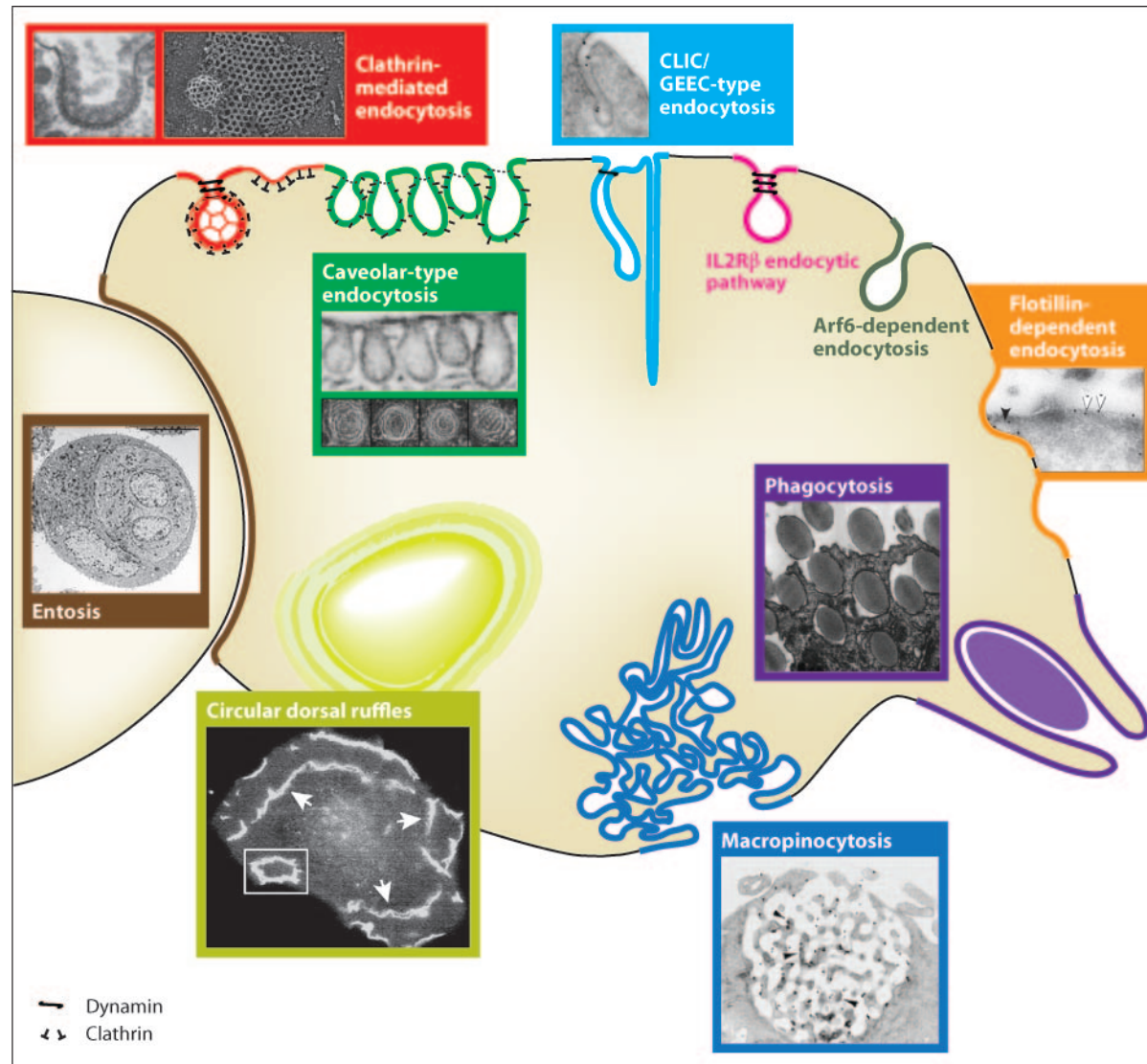
- **Endocytose**: endocytose médiée par la clathrine (CME), macropinocytose, endocytose médiée par les cavéoles/radeaux lipidiques et d'autres mécanismes encore mal caractérisés.
- **Fusion** de la membrane d'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique (protéines fusogènes)

L'endocytose amène le virus dans les compartiments vésiculaires de la voie endocytique

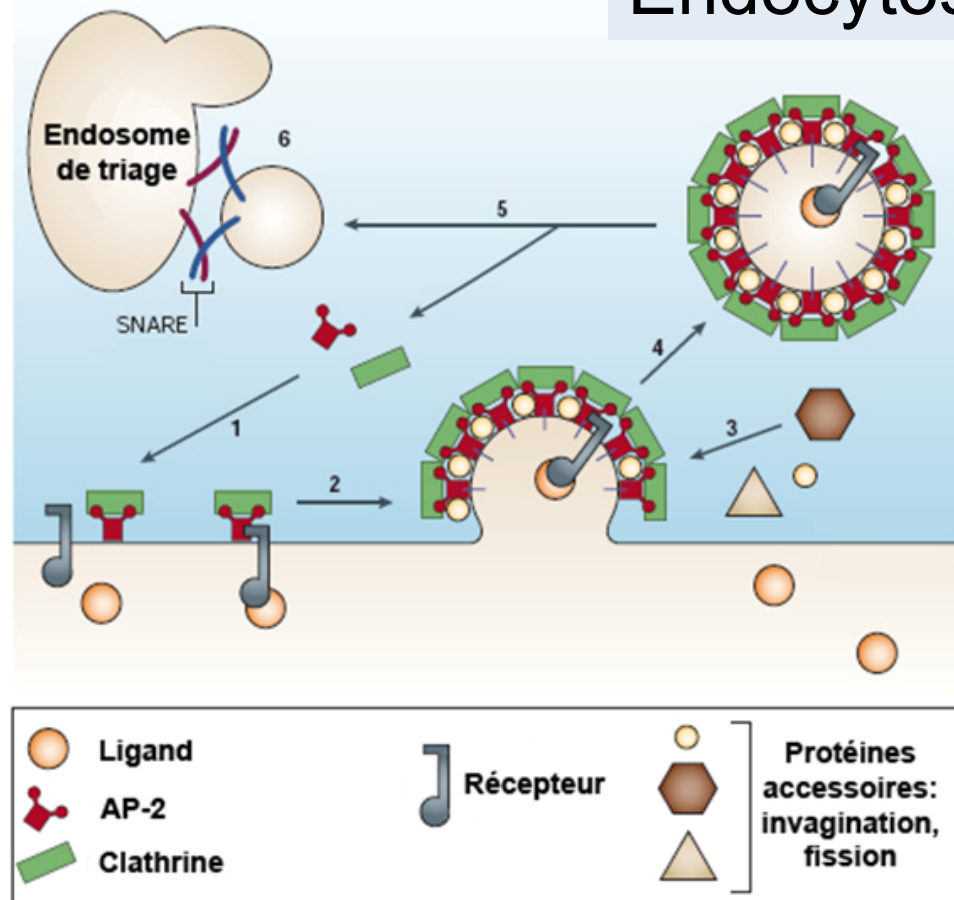
Quelles que soient les stratégies d'entrée utilisées, le cytosquelette d'actine est concerné

- Nécessité d'utiliser la dynamique de la polymérisation de l'actine afin de permettre le processus d'entrée.
- Nécessité de disloquer le réseau d'actine corticale afin de pénétrer efficacement dans le cytoplasme.

# Diversité des mécanismes d'endocytose



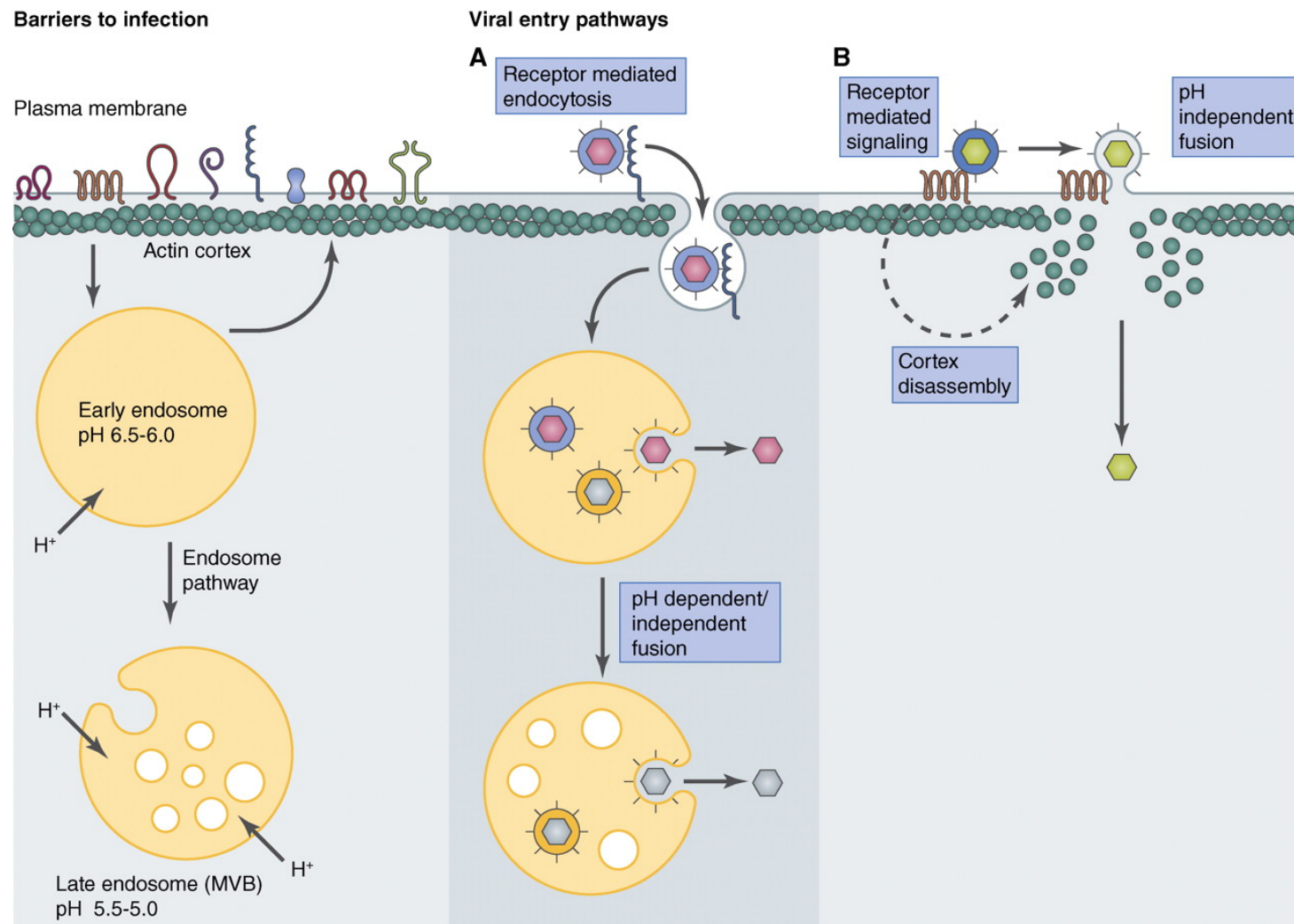
# Endocytose médiée par la clathrine



(1) Recrutement de la clathrine et de l'AP-2 à la membrane plasmique. (2) Les motifs d'endocytose par la clathrine contenus dans la queue intra-cytoplasmique des récepteurs destinés à l'endocytose sont reconnus par l'AP-2. (3 & 4) Il y a invagination et fission des vésicules de clathrine sous l'action des protéines accessoires (l'epsine, l'Eps15, la dynamine-2, l'endophiline, l'amphysine). (5) Le manteau de clathrine est retiré, permettant aux protéines d'être recyclées, alors que (6) la vésicule primaire fusionne avec les endosomes de triage sous l'action de Rab5 et de l'EEA1 et du complexe protéique SNARE



# Actine et entrée des virus dans les cellules

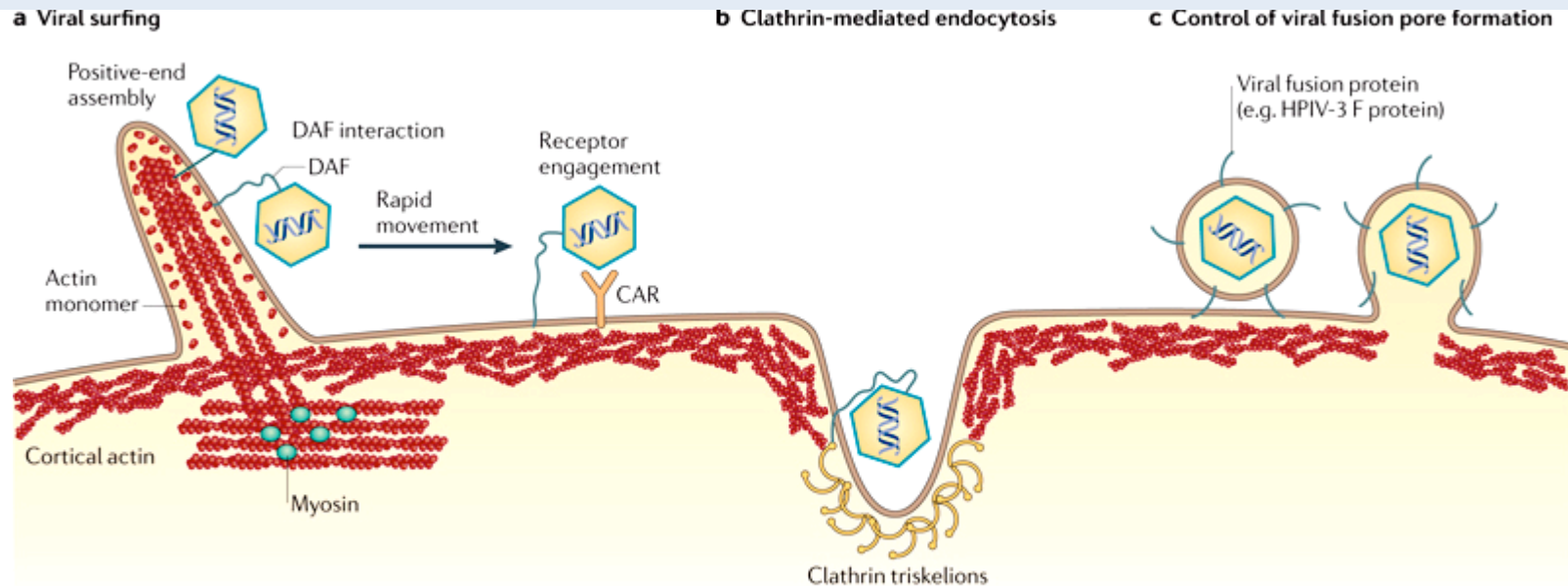


Pour revues complètes de l'entrée des virus par endocytose:

Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. 2010. Virus entry by endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 70:803-833

Doherty GJ & McMahon HT. 2009. Mechanisms of endocytosis, *78:857-902*

# Rôle des microfilaments d'actine dans l'entrée des virus



1 - "Viral surfing": la myosine II à la base du filopode tire les microfilaments du filopode alors que la synthèse côté + les pousse. Ce mouvement fait "surfer" les virus vers la base du filopode jusqu'à leur site d'entrée. Dans certains cas les virus se lient au DAF (glycoprotéine à ancre GPI), ce qui accélère le mouvement du virion et lui permet d'atteindre rapidement son récepteur CAR (Coxsackie & adenovirus receptor).

2 – L'actine renforce l'activité d'internalisation de la clathrine ((entrée médiée par la clathrine). Accroissement de la taille de la vésicule d'endocytose couverte de clathrine.

3 – Possible rôle de l'actine dans la facilitation de la survenue de fusion (protéines fusogènes) entre la membrane enveloppant le virion et la membrane cellulaire.(Human parainfluenzae = HPIV3). Protéine de fusion F

# Actine et accès du virus à l'intérieur de la cellule

## **Entrée du virus**

- Surfing du virion: facilite la progression rapide du virion vers son récepteur/vers des sites normalement masqués où se font avec grande efficacité l'endocytose ou la fusion (HIV, VSV, HPV, Vaccine)  
(Lehmann MJ et coll. 2005. J. Cell Biol.).

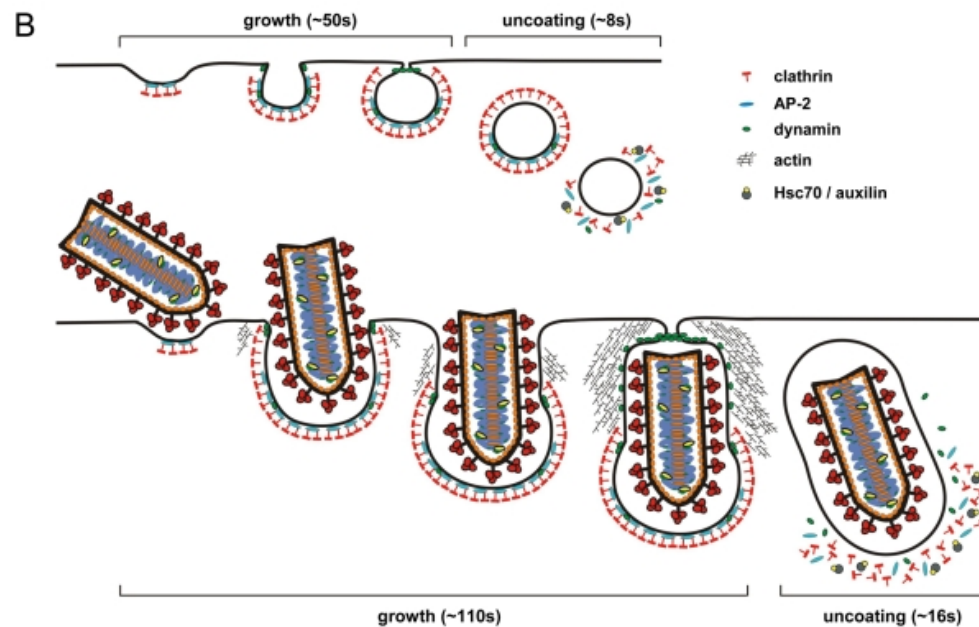
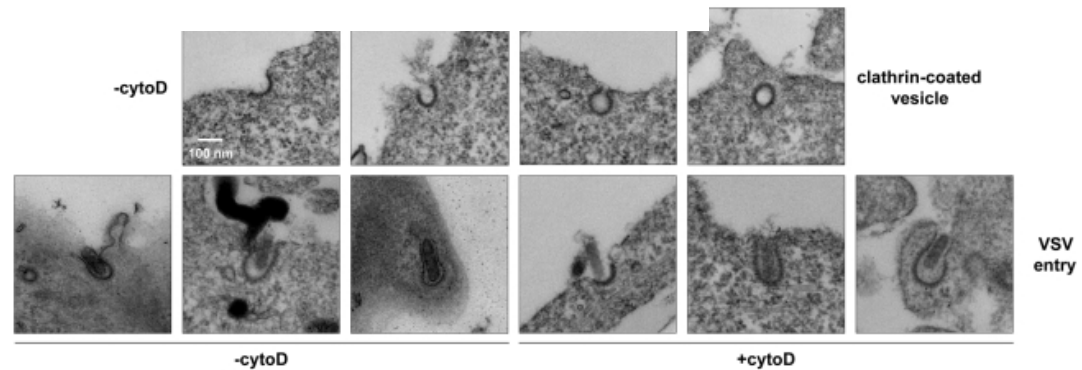
Coxsackie et Adenovirus lient le DAF, "surfent" et atteignent la jonction intercellulaire à l'apex des cellules épithéliales où se situe leur récepteur commun CAR autrement caché à l'accès direct des virions  
(Coyne CB & Bergelson JM. 2006. Cell)

**Endocytose** du virion. En général, la polymérisation de l'actine accroît l'efficacité de l'internalisation clathrine-dépendante des virions (KSHV, Ebola, VSV, virus Polio)  
(VSV = Cureton DK et coll.2009. PLoS Pathog.)

# Vesicular Stomatitis Virus Enters Cells through Vesicles Incompletely Coated with Clathrin That Depend upon Actin for Internalization

David K. Cureton<sup>1,2</sup>, Ramiro H. Massol<sup>3,4,5</sup>, Saveez Saffarian<sup>4,5</sup>, Tomas L. Kirchhausen<sup>4,5\*</sup>, Sean P. J. Whelan<sup>1,2\*</sup>

April 2009 | Volume 5 | Issue 4 | e1000394



# Actine et accès du virus à l'intérieur de la cellule

**Fusion des membranes virales et cytoplasmiques.** Les paramyxovirus comme le RSV humain (HRSV) et le virus parainfluenzae humain de sérotype 3 (HPIV-3) codent pour une glycoprotéine d'attachement G (hémagglutinine-neuraminidase) et une protéine de fusion F nécessaires à l'entrée du virion enveloppé.

L'entrée est suivie de la formation de syncytia dus à la protéine F. La cytochalasine D qui bloque la polymérisation de l'actine diminue l'entrée et la formation de syncytia. RhoA est un régulateur clé de ce processus (Pastey MK et coll. 2000. Nat Med.)

**Exemple développé: entrée du VIH dans les lymphocytes et actine.**

**Aggrégation (clustering) des récepteurs:** essentielle à la signalisation et nécessite une polymérisation de l'actine.

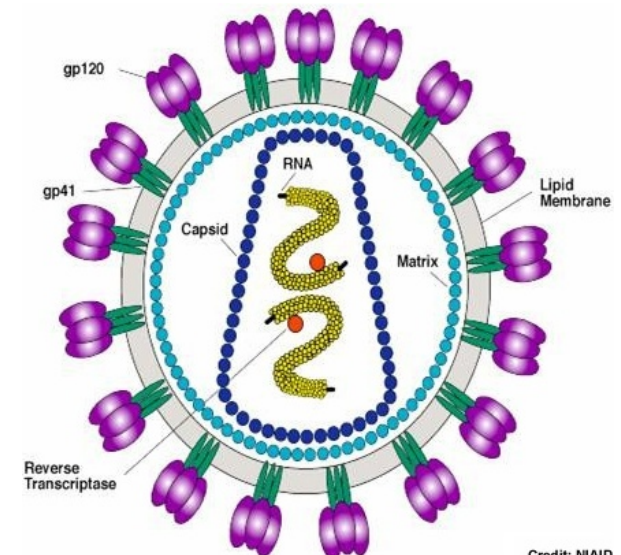
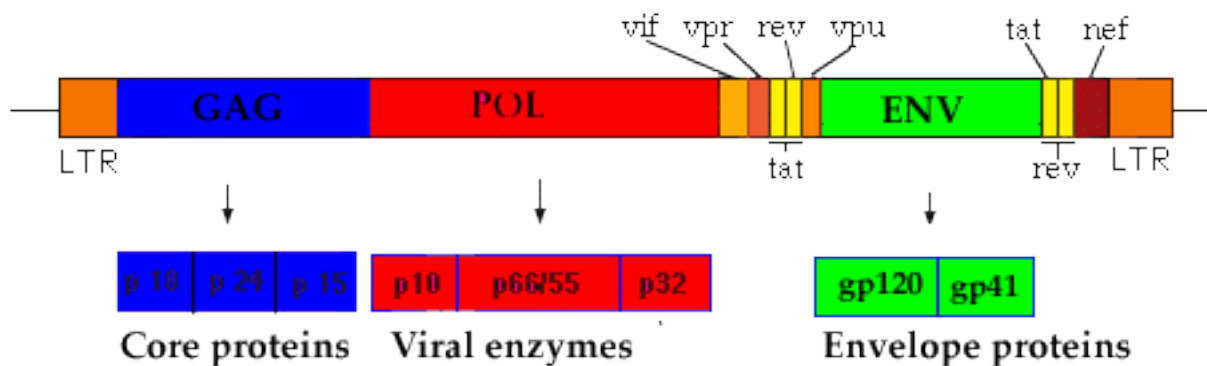
Entrée de VIH médiée par Env nécessite l'activation des petites GTPases Rho et de protéines de remodelage de l'actine comme la filamine et la cofiline.

# VIH et actine

Même les virus enveloppés qui pénètrent dans le cytoplasme à la suite de la fusion de leur enveloppe avec la membrane cytoplasmique doivent assurer un degré significatif de subversion du cytosquelette d'actine:

Ex: **le VIH:**

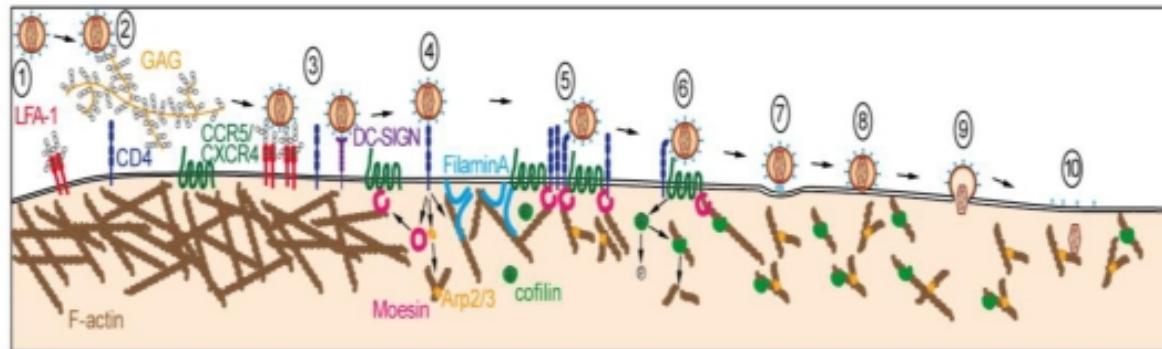
Signalisation secondaire à l'engagement des récepteurs de surface cellulaire par **Gp120** et expression de protéines accessoires, en particulier **Nef**



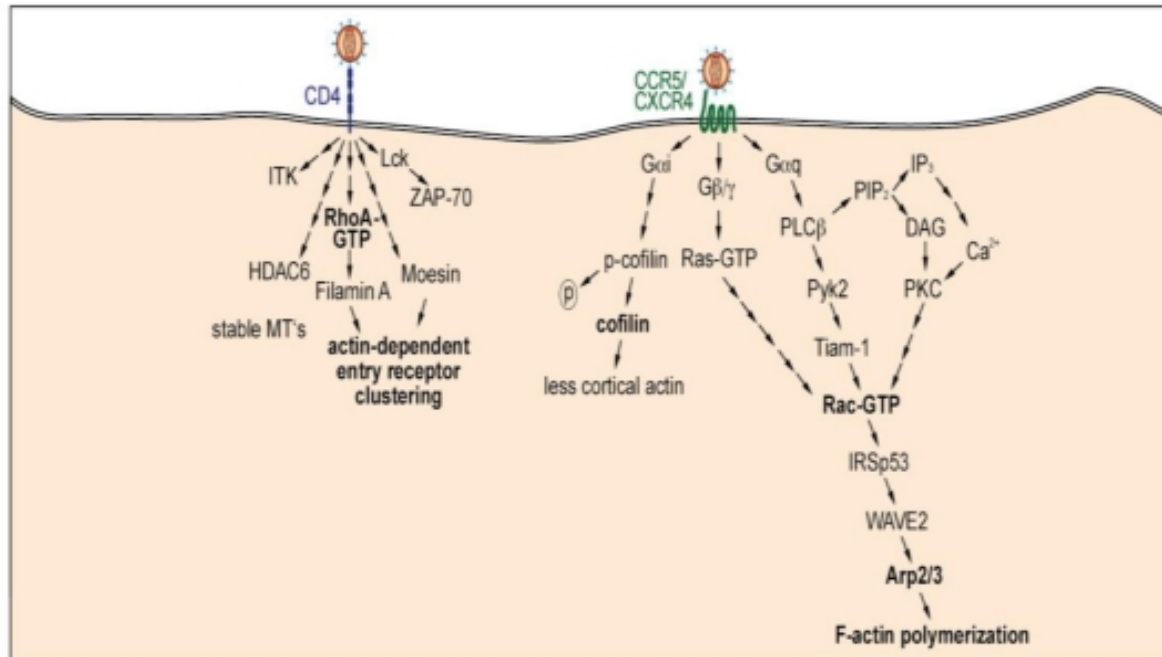


# Manipulation du cytosquelette d'actine par le VIH: signaux médiés par les récepteurs; de surface engagés

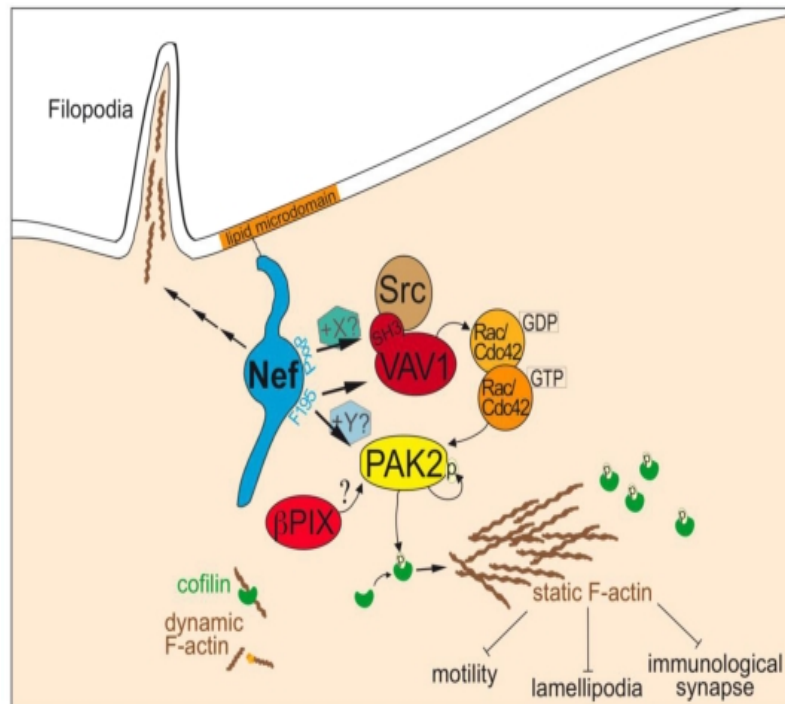
A



B



# Nef est important pour la réplication virale



**Nef** induit la formation d'un macrocomplexe moléculaire contenant la kinase PAK2 (+ Rac-1 / Vav) pour altérer la dynamique du cytosquelette. L'assemblage Nef-PAK2 se fait dans les "rafts" de la membrane cytoplasmique.

Activité centrale = phosphorylation de la cofiline entraînant une réduction du turn over de l'actine (Stolp B et coll. 2010. J. Virol.)

Deux effets principaux:

1 – Altération du remodelage de l'actine au moment de l'engagement du TCR. Altération de l'activation des lymphocytes T.

(Friedl P et coll. 2005. Nat. Rev. Immunol.)

2 – Altération du remodelage de l'actine en réponse à des chimioattractants.

Diminution de la mobilité le long d'un gradient chimioattractant.

(Stolp B et coll. 2009. Cell Host & Microbe)

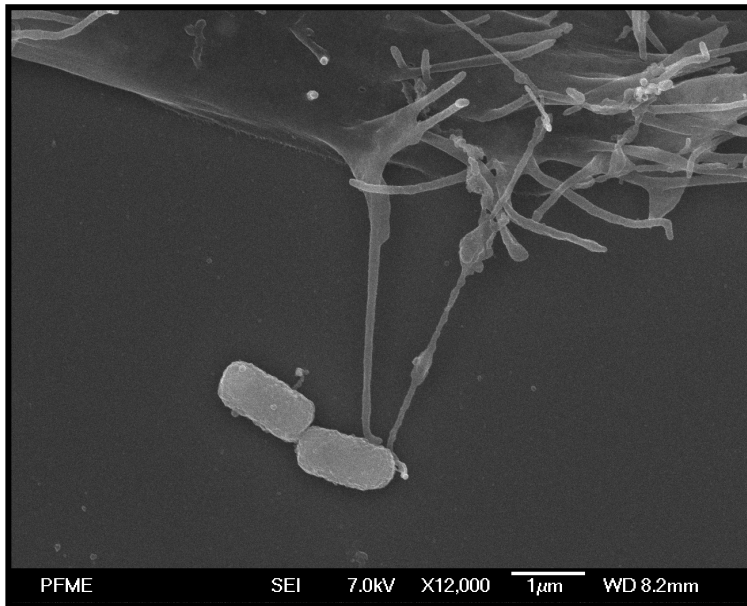
## Formation d'extensions cellulaires

**Les virus HSV** (Herpes Simplex Virus) ont la capacité de stimuler une capture accrue de virions par plusieurs mécanismes dont l'extension de structures filopodiales de la surface de la cellule infectée.

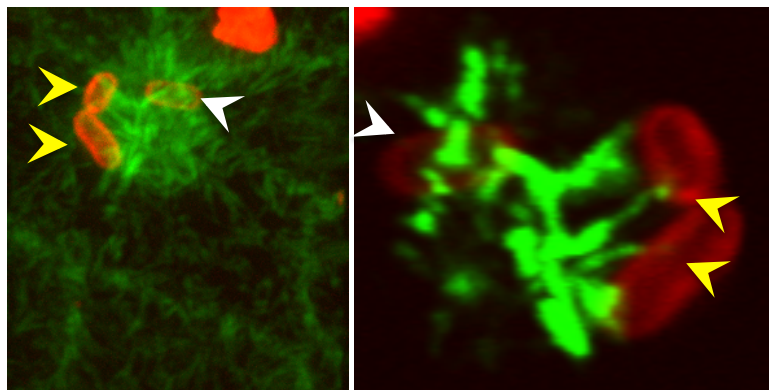
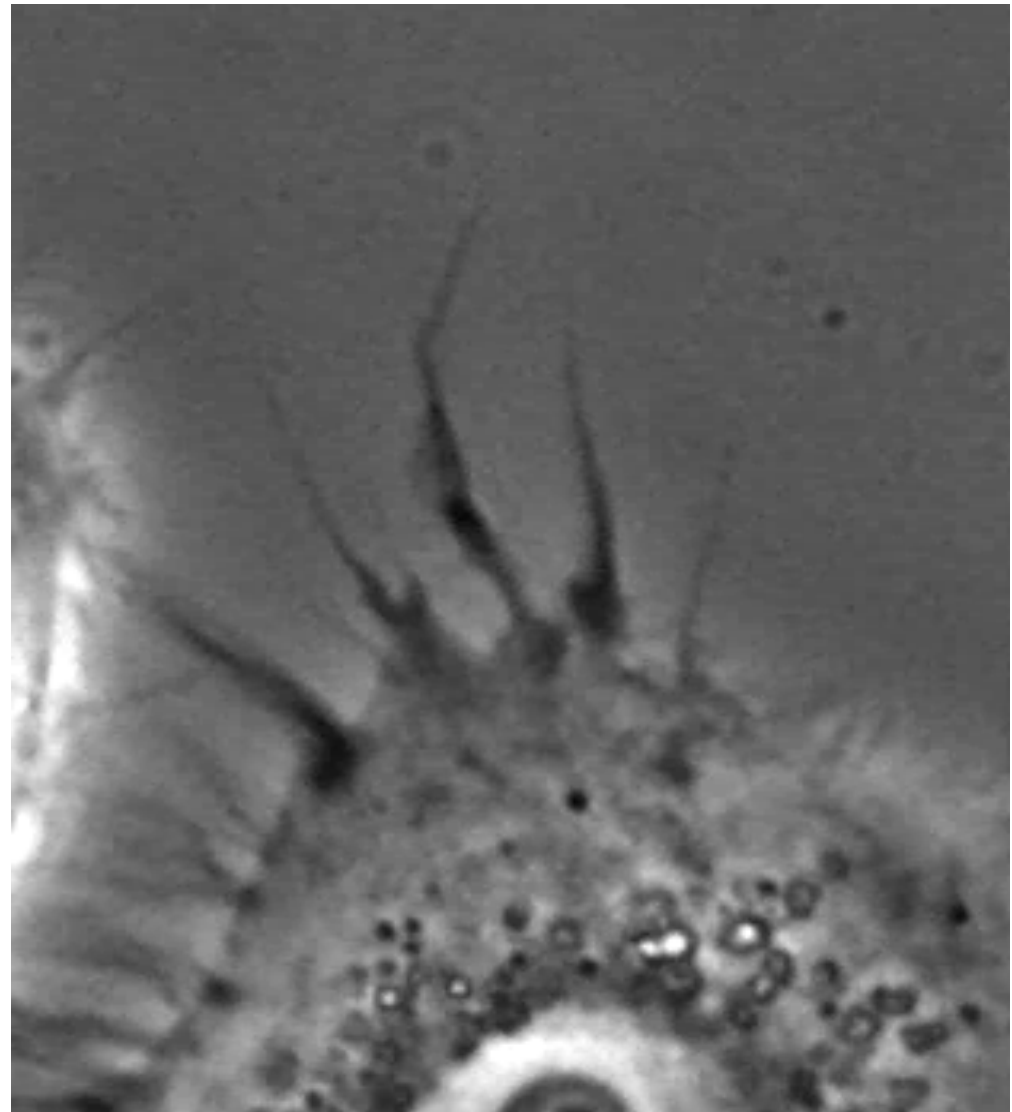
Activation de RhoA durant l'entrée. Formation de longs filopodes structurés par l'assemblage de microfilaments d'actine (Clement C et coll. 2006. J. Cell Biol.)

**Les virus HPV** (Human Papilloma Virus) au cours de l'entrée dans les cellules causent une dissolution rapide des câbles de stress et la formation d'extension filopodiales de la surface de la cellule dépendante de l'actine et de l'activation de tyrosine kinases (non identifiées (MAPK ?) et de la Pi3Kinase (Smith JL et coll. 2008. Virology)

## *Shigella* capture and entry into cells



HeLa/Cx26 or ATP, 10mM



Bacterial capture by filopodia at apical surface of polarized IECs

# Rôle de l'actine à tous les stades de l'interaction virus-cellule

## **Actine et replication/assemblage et dissémination du virus**

Augmentation de la réplication virale

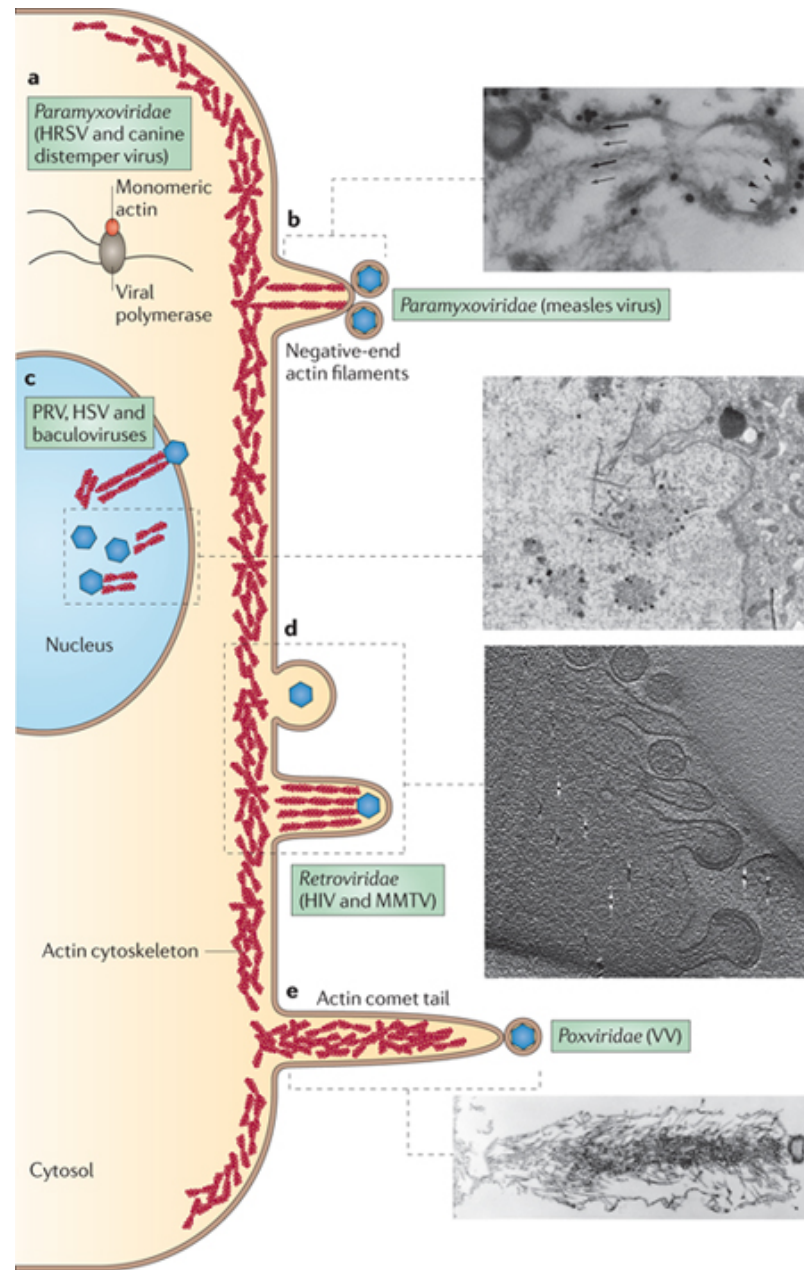
Assemblage viral et mouvement

Sortie du virus et dissémination

Bourgeonnement viral

Induction d'extensions

Rupture cellulaire





## Réplication et assemblage des virions

**Augmentation de la réplication virale:** domaine mal connu. L'actine monomérique et la profiline sont impliquées dans la réplication de l'ARN de HRSV (Burke E. 2000. J. Virol.)

**Mouvement** des génomes et protéines virales vers les sites d'assemblage cytoplasmique dépend de l'actine.

L'actine est nécessaire aux différents stades du transports des composants ARN et protéines du VIH, vers le noyau puis à l'extérieur dans les étapes d'assemblage (Jolly C et coll. 2007. J. Virol.)

## Sortie et dissémination des virus

La sortie des virions comporte en miroir de l'entrée une interaction avec le cytosquelette d'actine. Une étape clé sera le passage du réseau d'actine sous-cortical

Bourgeonnement viral:

MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) un rétrovirus = premier exemple d'un rôle pour l'actine dans l'échappement du virus de la cellule. Les virions sortant de la cellule apparaissent être libérés à l'extrémité d'une longue protrusion/microvillosité (Akiyama T et coll. 1986. J. Biol. Chem.)

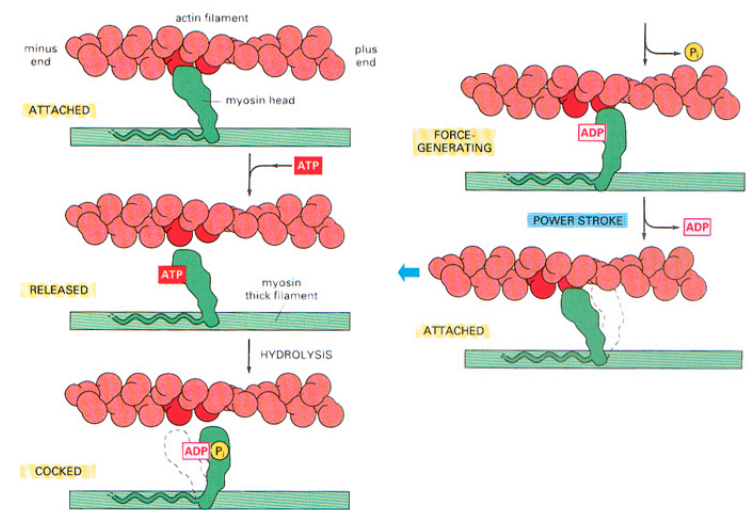
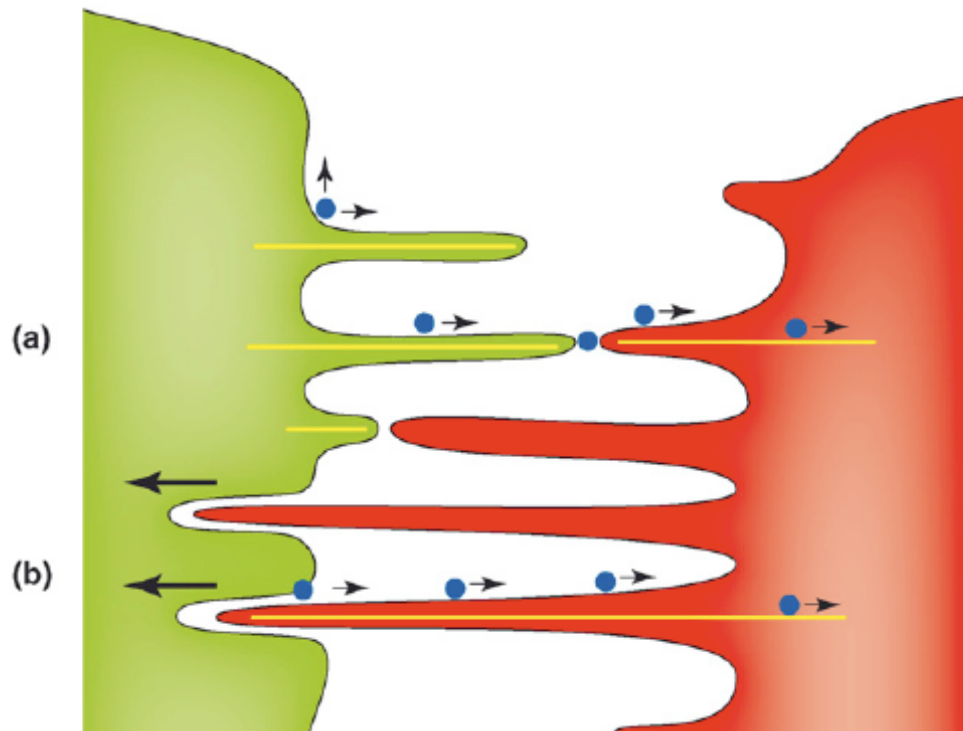
Même observation pour le VIH (Carlson LA et coll. 2010. PLoS Pathog.)

Production d'extensions de la surface cellulaire:

Il semble que la transmission de cellule à cellule des rétrovirus se fasse essentiellement par l'intermédiaire d'extensions filopodiales (cytonèmes ou nanotubes)

(Sattentau Q. 2008. Nat. Rev. Microbiol.)

# Des virus (HIV, MLV) surfent sur les filopodes avant l'invasion cellulaire utilisant myosine II et flux rétrograde



# Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells

Maik J. Lehmann,<sup>1</sup> Nathan M. Sherer,<sup>1</sup> Carolyn B. Marks,<sup>2</sup> Marc Pypaert,<sup>2</sup> and Walther Mothes<sup>1</sup>

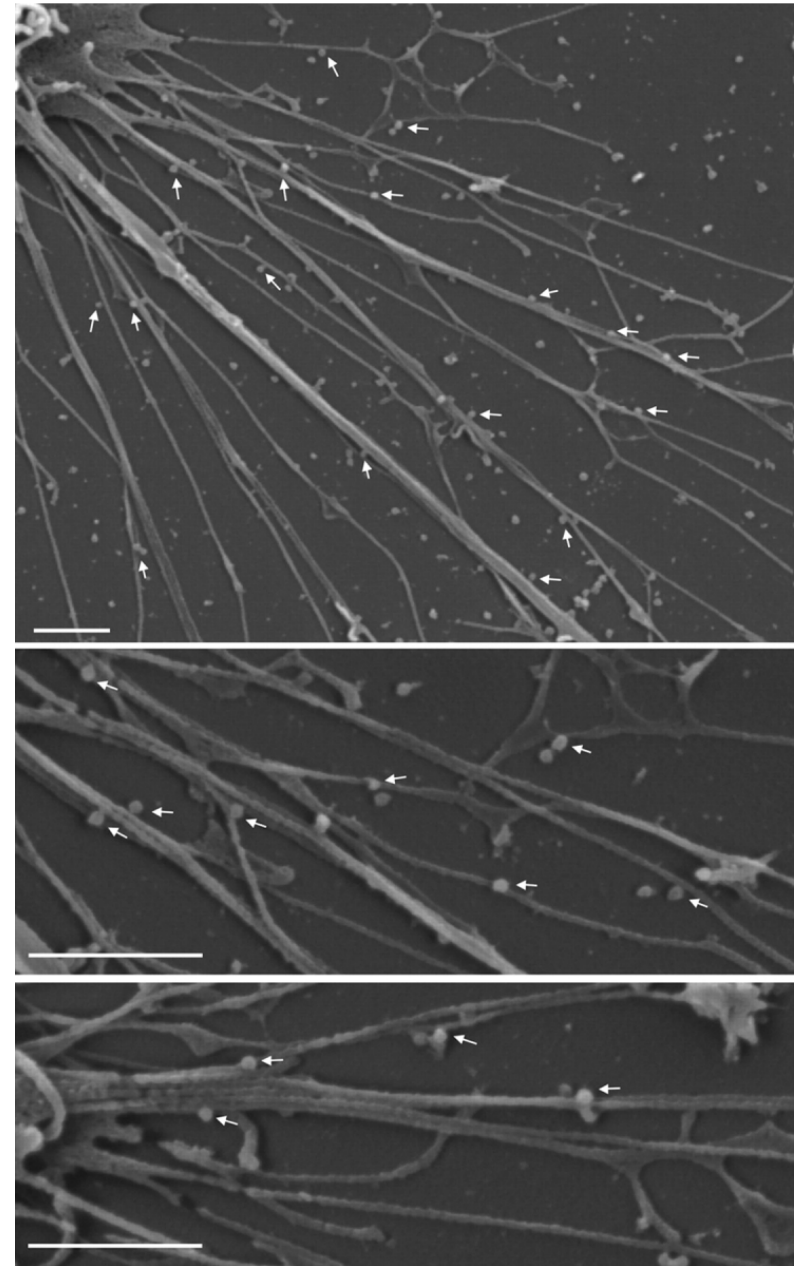
<sup>1</sup>Section of Microbial Pathogenesis and <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06536

© The Rockefeller University Press \$8.00  
The Journal of Cell Biology, Vol. 170, No. 2, July 18, 2005 317-325  
<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200503059>

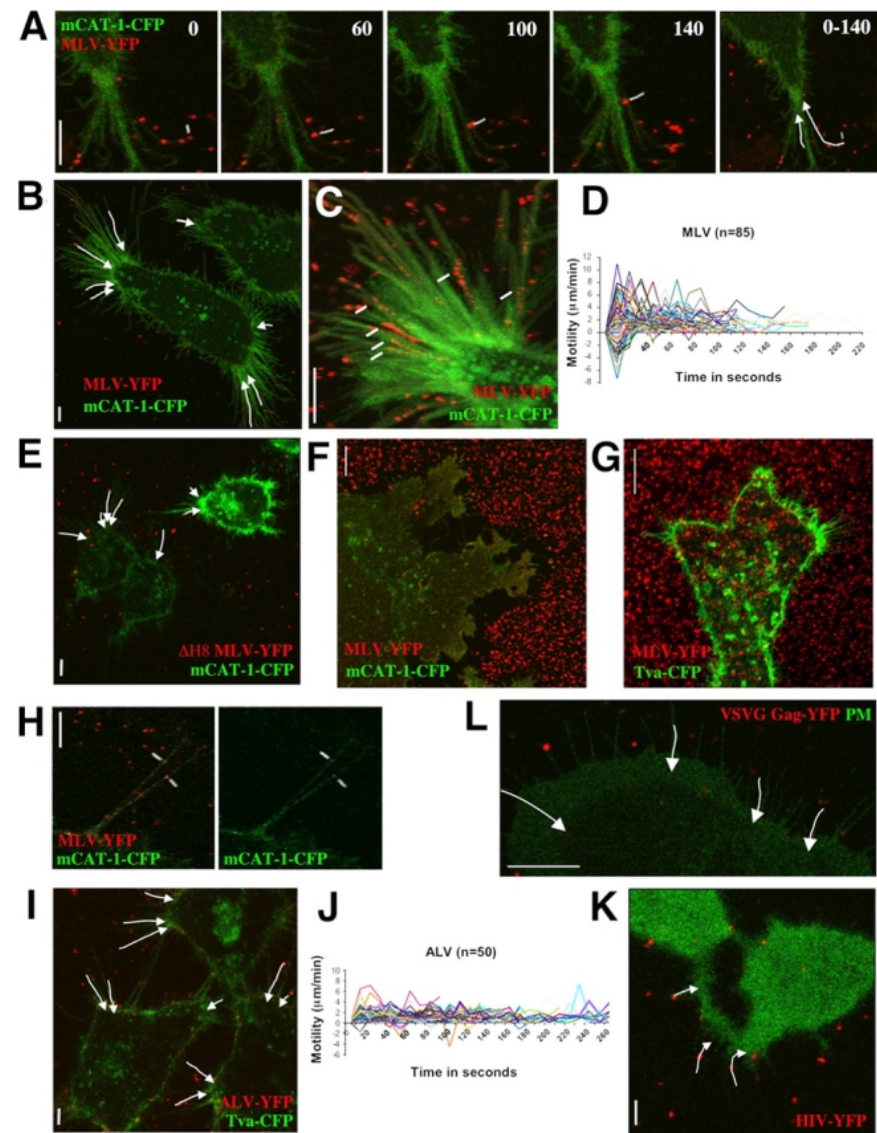
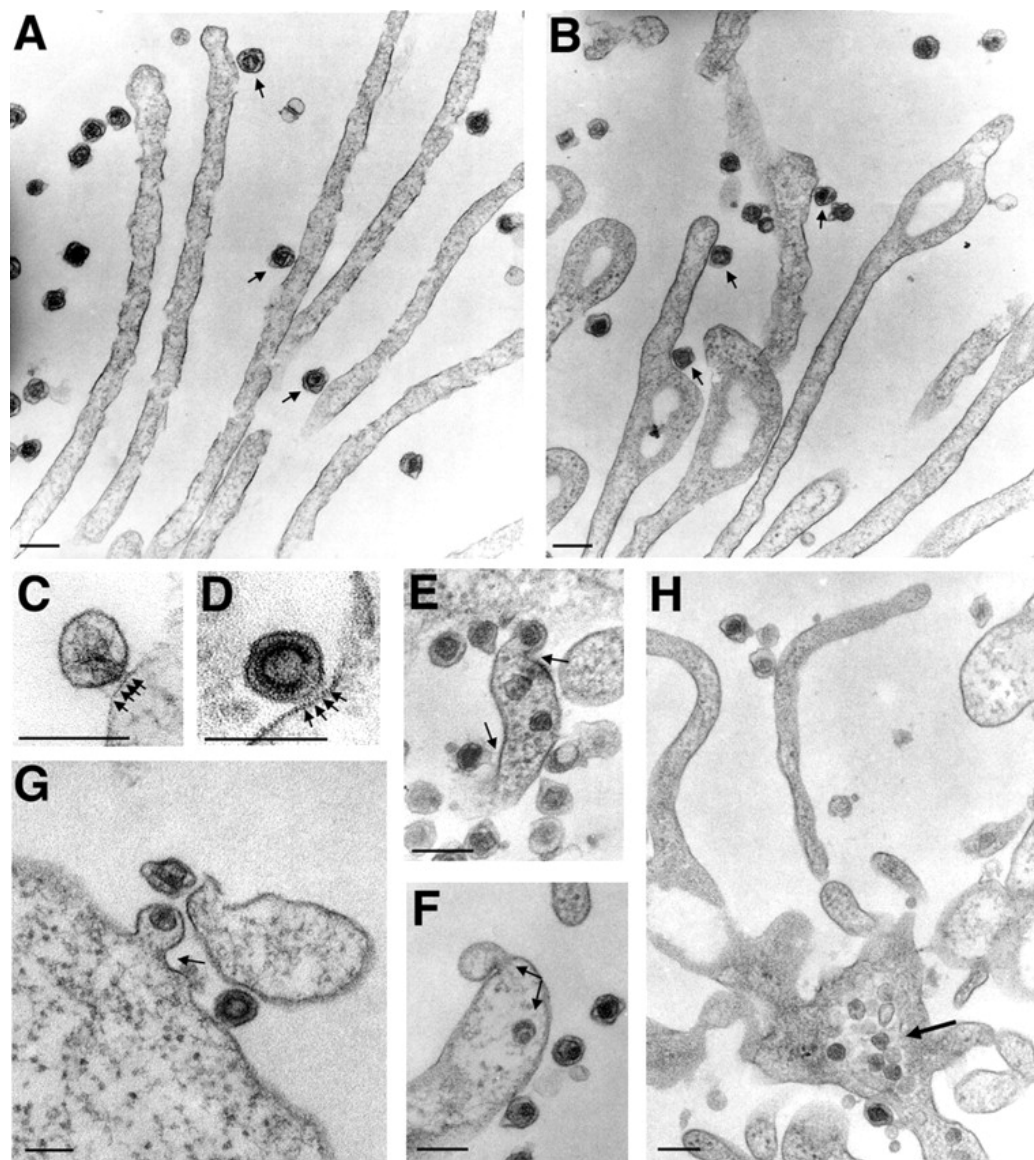
**Murine Leukaemia Virus (MLV) = rétrovirus.**  
Virus enveloppé surfant sur des nanotubes.

Mouvement dépendant de l'actine  
et de la myosine II

La rupture de ce mouvement perturbe  
considérablement la transmission des virus  
de cellule à cellule.







## Extensions filopodiales: un phénomène général dans la dissémination virale ?

**La protéine Nef de VIH** est responsable de la formation d'extensions filopodiales dans les cellules Jurkat (lignée de cellule T).

Le mode d'action est via PAK-2 et N-WASP  
(Haller C et coll. 2007. PLoS ONE)

D'autres virus utilisent ce mode de transmission intercellulaire:

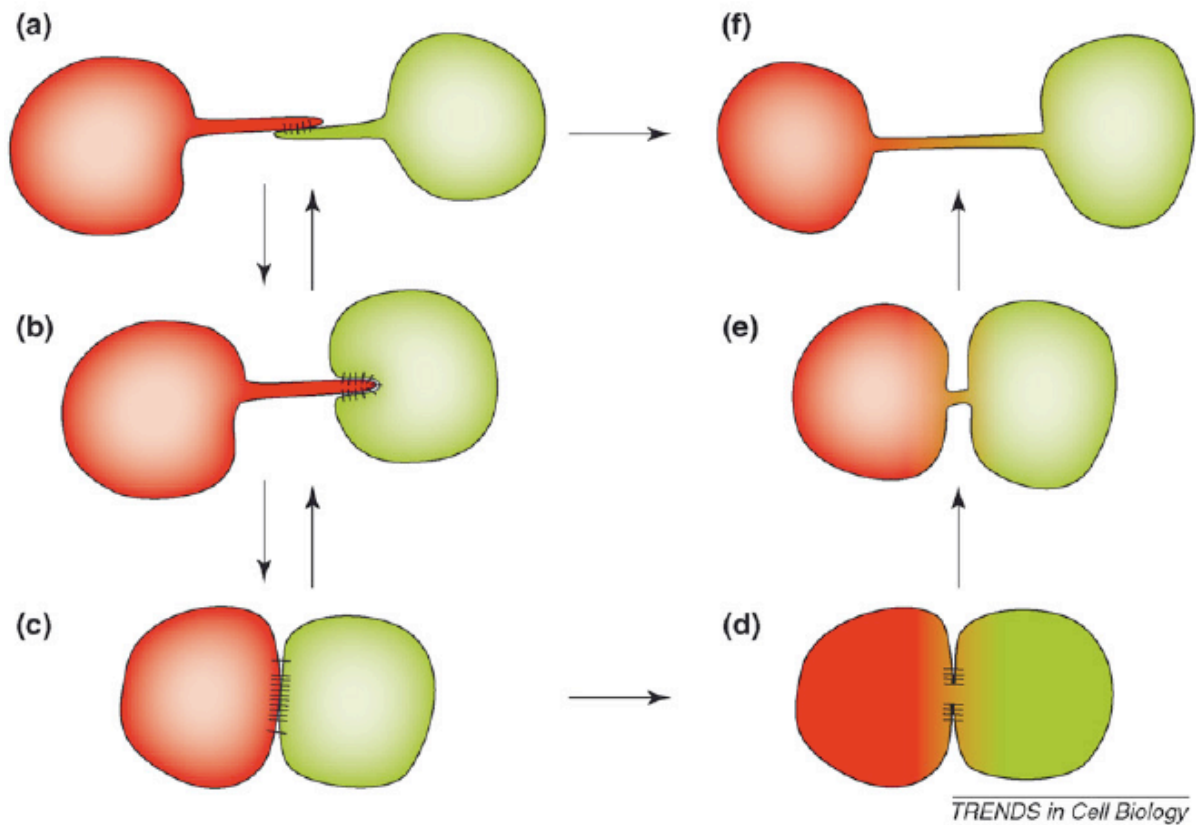
**HSV** (Favoreel HW et coll. 2010. Vet. Microbiol.)

**PRV** (Pseudorabies virus) induit la formation de nanotunnels via une kinase virale US3 (Minnebruggen GV et coll. 2003. J. Virol.)

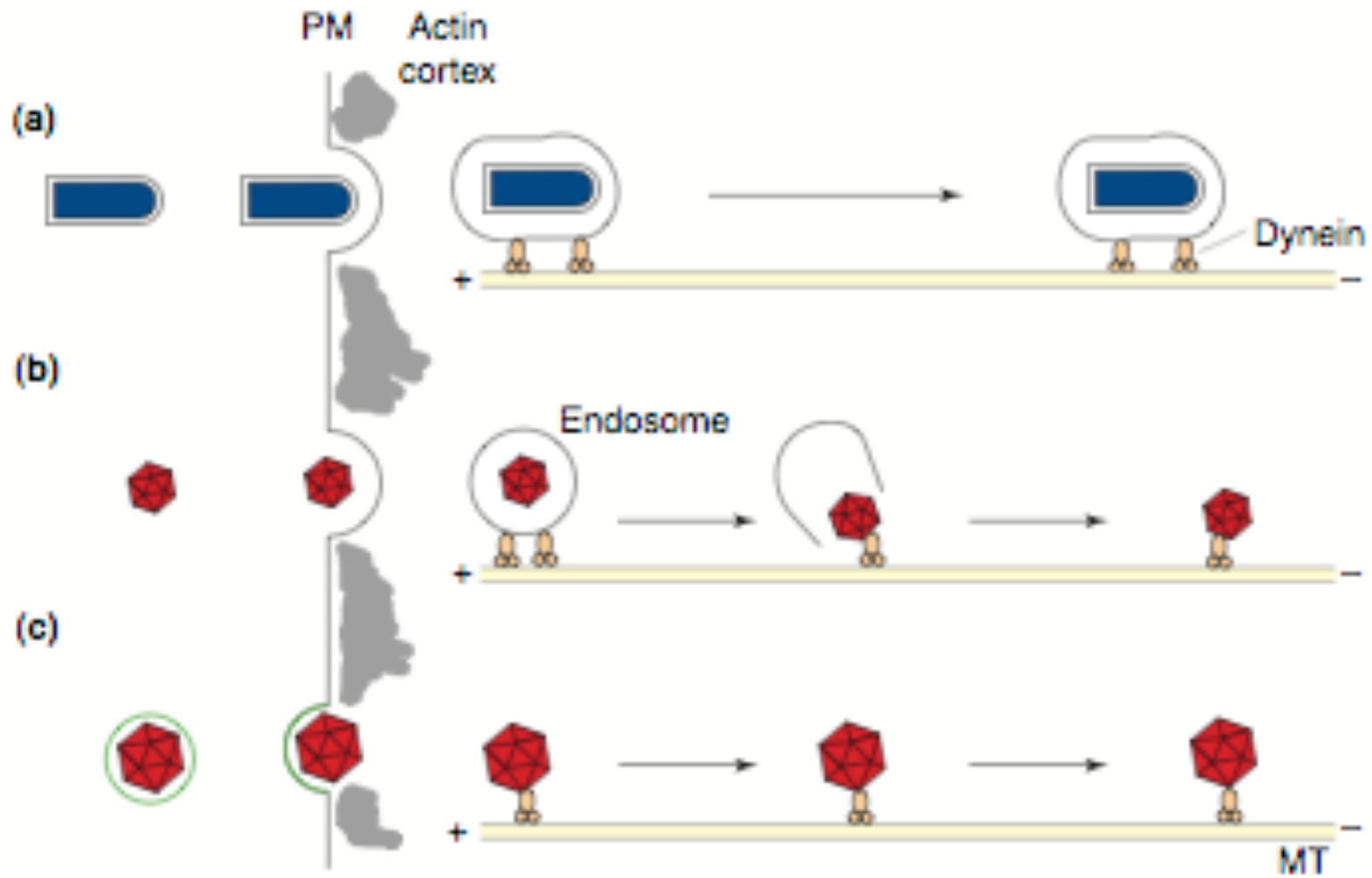
**Les rotavirus** utilisent un processus similaire de dissémination entre les cellules épithéliales intestinales. La protéine NSP4 est capable d'induire la formation de longues extensions à partir des cellules  
(Berkova Z et coll. 2007. J. Virol.)



Filopodes = senseurs extracellulaires, contacts de cellule à cellule, médiateurs de l'adhérence cellulaire  
Filopodia : extracellular sensors, intermediate in cell adhesion, cell-cell contact

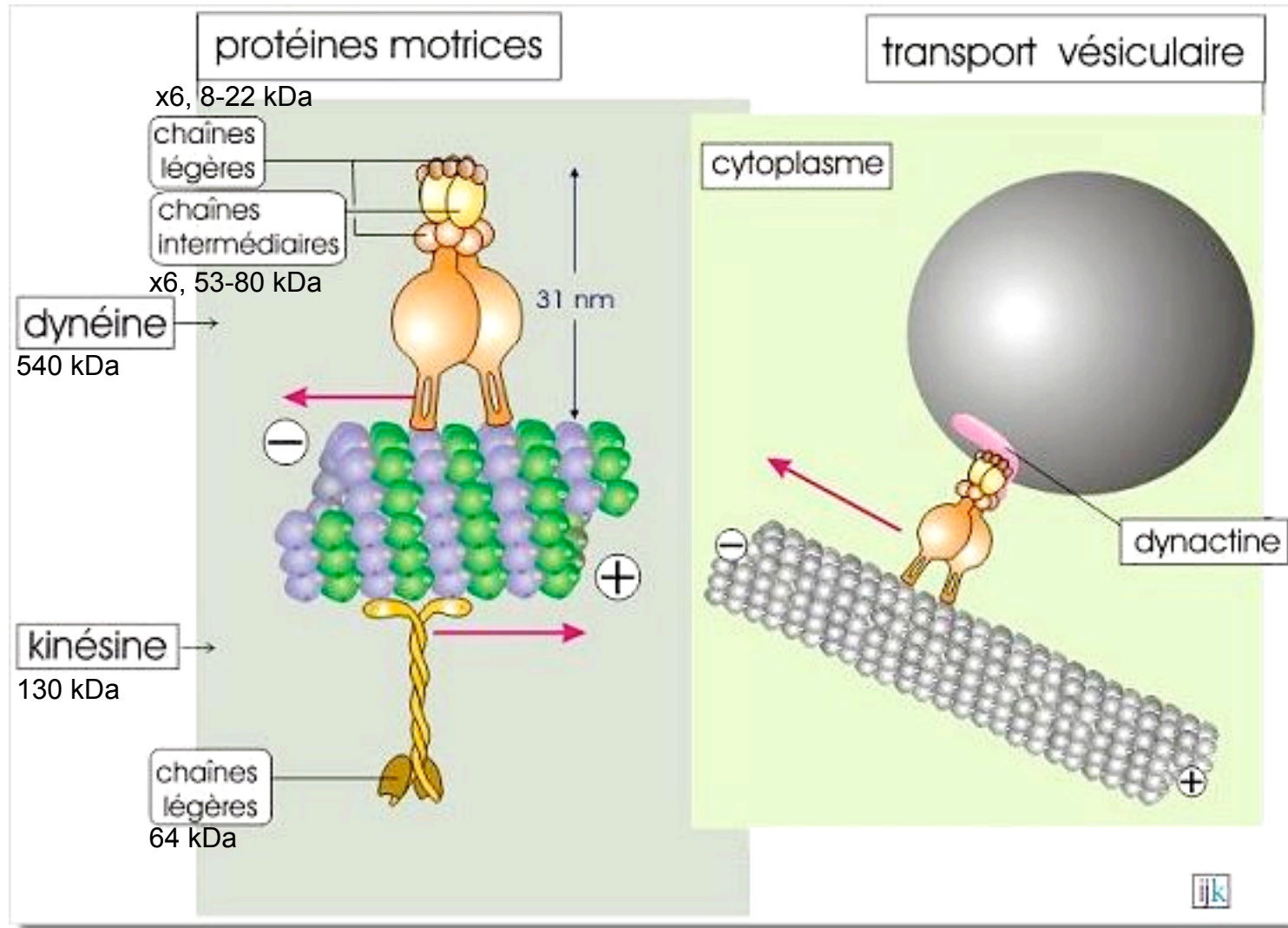


# Entrée et migration des virus dans le cytoplasme

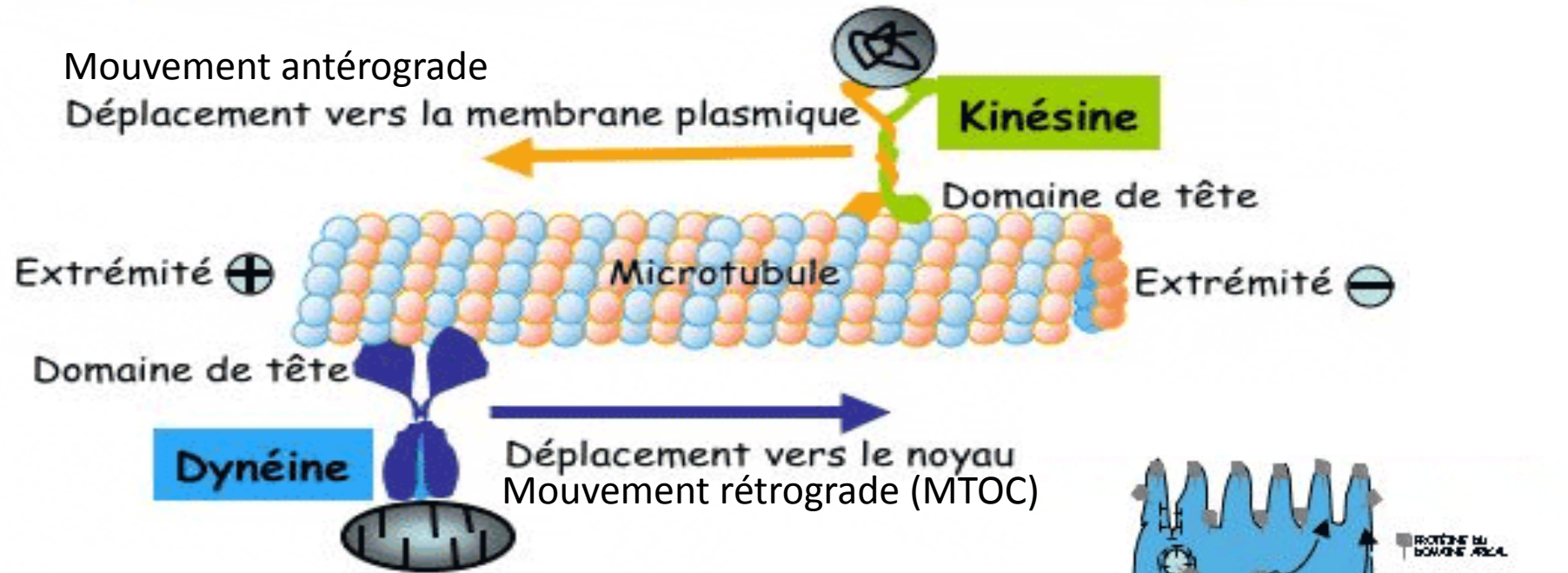


# Protéines motrices interagissant avec les microtubules

Force motrice produite par l'hydrolyse de l'ATP



# Kinésine et Dynéine: moteurs moléculaires des microtubules



- Transport de vésicules membranaires entre réticulum endoplasmique et appareil de Golgi.
- Tri et adressage des protéines dans les cellules polarisées: les vésicules membranaires issues du Golgi et contenant les protéines destinées au pôle apical ou baso-latéral sont transportées par les protéines motrices le long des microtubules.
- Mouvement des organites: les microtubules sont en grande partie responsables, avec les moteurs associés, de l'organisation spatiale et des mouvements dirigés des organites dans le cytoplasme: mitochondries, chromosomes lors de la division cellulaire (fuseau mitotique et ségrégation des chromosomes).
- **Transport viral**, battement cils & flagelles

## Rôle des microtubules et des transporteurs dédiés dans le cycle viral

Le transport assuré par la dynéine ou la kinésine sur les microtubules joue un rôle essentiel dans la réplication et la dispersion de nombreux virus.

La compréhension de ces mécanismes est essentielle au déchiffrement des stratégies de la pathogénèse virale, mais aussi à la compréhension de phénomènes fondamentaux de la biologie de la cellule.

Parmi les virus concernés, un certain nombre ont été particulièrement étudiés: Adénovirus,  $\alpha$ -Herpes virus (HSV1), Virus de la pseudorange (PRV), VIH-1 et virus de la vaccine (VV).

Si l'évidence du rôle des microtubules dans la réplication et la dispersion des virions est souvent évident, la démonstration des bases moléculaires de la décision d'utiliser un mode de transport microtubulaire antérograde ou rétrograde reste souvent insuffisante.

Dohner K et coll. 2005. Mol. Biol. Cell

Greber UF & Way M. 2006. Cell

Radtke K et coll. 2006. Cell. Microbiol.

Brandenburg B & Zhuang X. 2007. Nat. Rev. Microbiol.

Ward BM. 2011. Virology

Dodding MP & Way M. 2011. EMBO J.

# Rôle des microtubules et des transporteurs dédiés dans le cycle viral

Étapes principales concernées:

Transport des acides nucléiques +/- des protéines du core vers les sites de réplication immédiatement après l'entrée = **Transport rétrograde.**

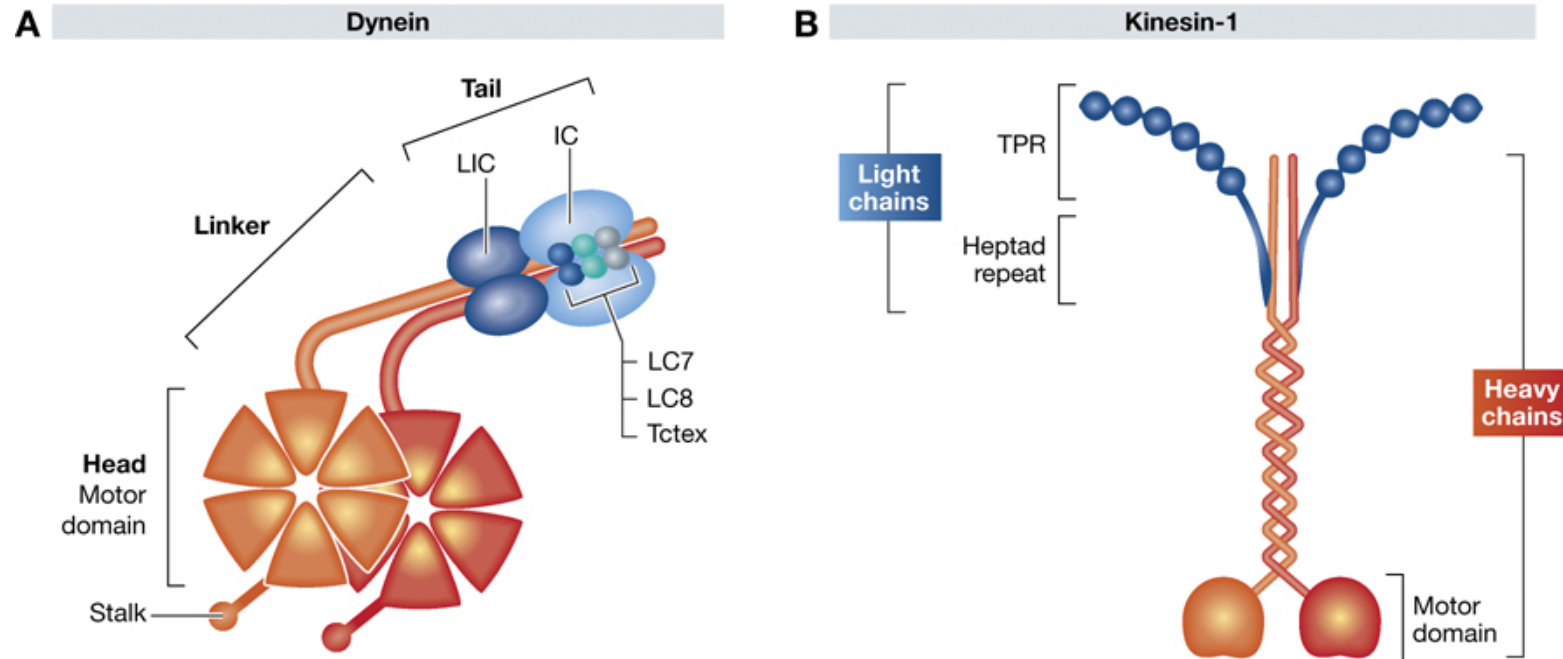
Transport des nouveaux virions vers la membrane plasmique afin d'assurer la dissémination du virus et l'infection des cellules adjacentes et des tissus = **Transport antérograde.**

Transport d'acides nucléiques et de protéines impliquées dans l'assemblage du virion vers des sites cellulaires spécifiques ("usines virales"), ou transport de virion plus ou moins matures vers des sites clés de cette maturation = **Transport rétrograde ou antérograde**



# Dynéine et de la Kinésine-1

Dodding MP & Way M. 2011. EMBO J.



**Dynéine:** le domaine moteur est composé de 6 domaines ATPases AAA arrangés en un anneau hexamérique d'où émerge une tige de liaison aux microtubules (stalk). l'extrémité N-terminale de la queue assure la dimérisation de la molécule et contient les sites de liaison pour les deux chaînes intermédiaires (IC) et deux chaînes légères intermédiaires (LIC). Les deux IC lient trois paires de chaînes légères (LC) et comportent des sites de liaison pour la Dynactine (régulation & liaison à la charge) (Kardon JR & Vale RD. 2009. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.).

**Kinésine-1** hétérotétramère composé de deux chaînes lourdes dont le N-term. assure la fonction motrice et de deux chaînes légères. La moitié C-term. des chaînes légères comporte des répétitions tétratricopeptides (TPR) = des sites de liaison des charges.

# Transport des **adénovirus**: interaction directe virus-Dynéine

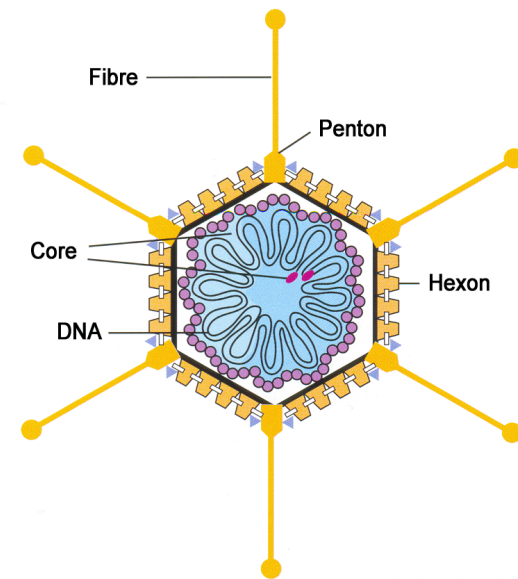
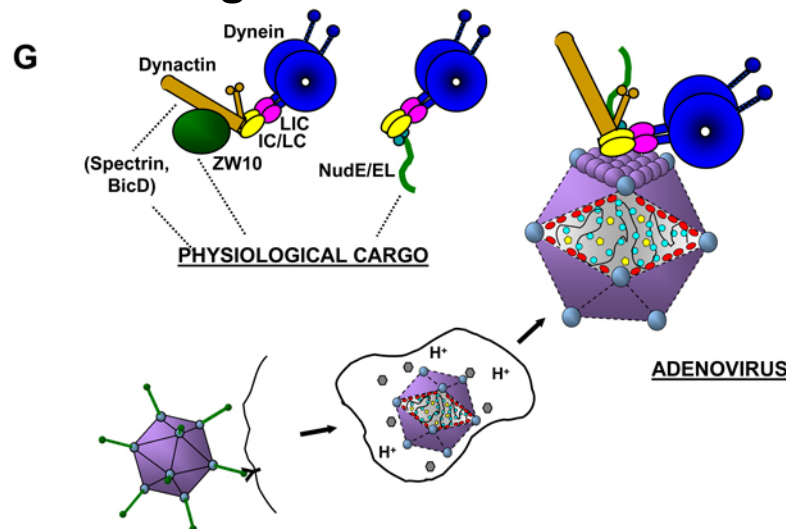
Même si beaucoup de virus semblent concernés par le transport microtubulaire rétrograde et antérograde pour leur réplication et dissémination, il existe encore peu de situations dans lesquelles les bases moléculaires en ont été clairement caractérisées (molécules assurant l'interaction côté virus et hôte)

**Adénovirus**: très vite au cours de l'infection les adénovirus internalisés sont transportés vers le noyau sous forme de capsid nue transportées par les microtubules après recrutement de la Dynéine (transport rétrograde).

La Dynéine interagit directement via ses IC et LIC avec la sous unité hexon de la capsid virale. Processus indépendant de la Dynactine.

Cette interaction est dépendante d'un bas pH, indiquant que le virus doit être issu d'un compartiment endosomal tardif pour engager la Dynéine.

**Transport antérograde vers la sortie de la cellule ???**



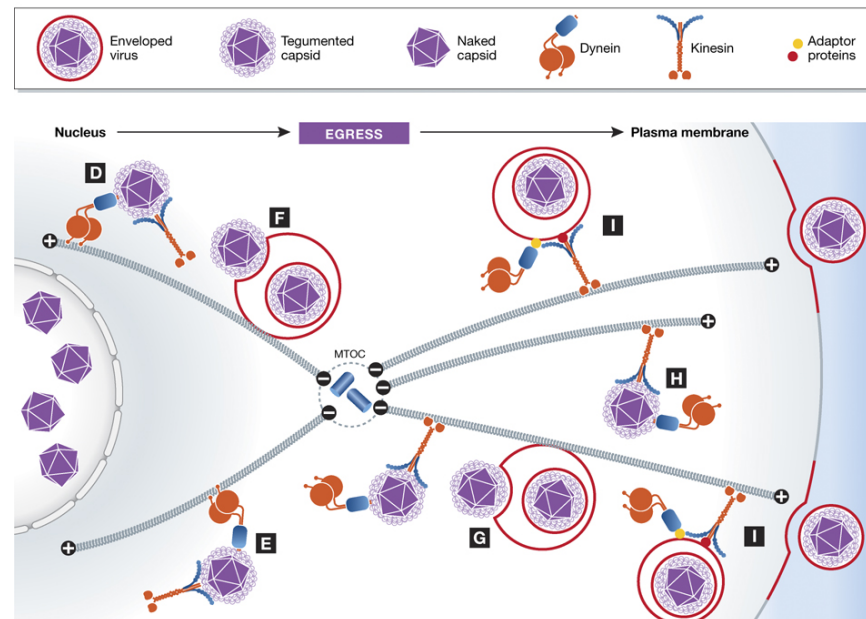
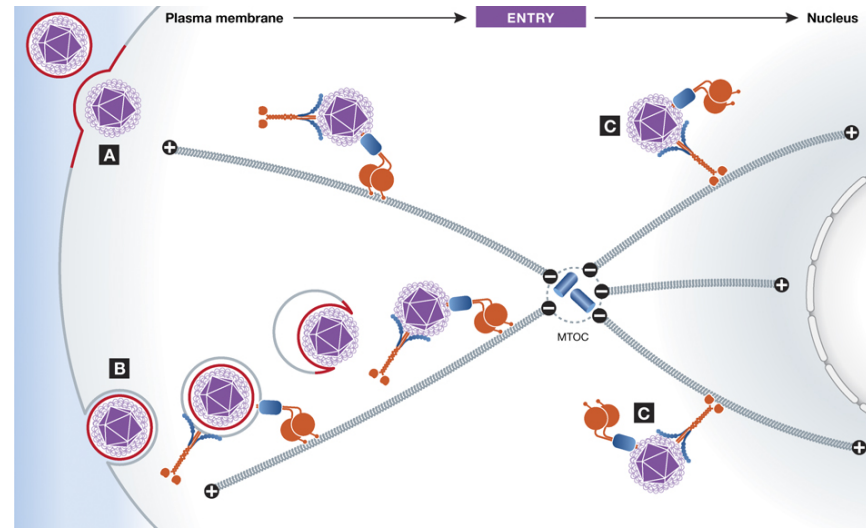
# Transport de **HSV1**: entrée dans et sortie de la cellule

**ENTREE:** selon la cellule, fusion ou endocytose. Les capsides nues recrutent Dynéine et Kinésine, mais le transport net est rétrograde vers MTOC/noyau.

Selon la position du MTOC, Kinésine-1 pourrait aussi servir au virion pour atteindre la membrane nucléaire.

Entrée dans le noyau pour assurer l'infection chronique

**SORTIE:** suivant la sortie du noyau, les protéines tégmentaires de la capside non enveloppée recrutent Dynéine et Kinésine-1. Selon la position du MTOC, transport antérograde (K) ou rétrograde (D) permet à la capside d'acquérir une enveloppe dans un compartiment variable selon la cellule. Globalement: transport antérograde-membrane cytoplasmique - sortie

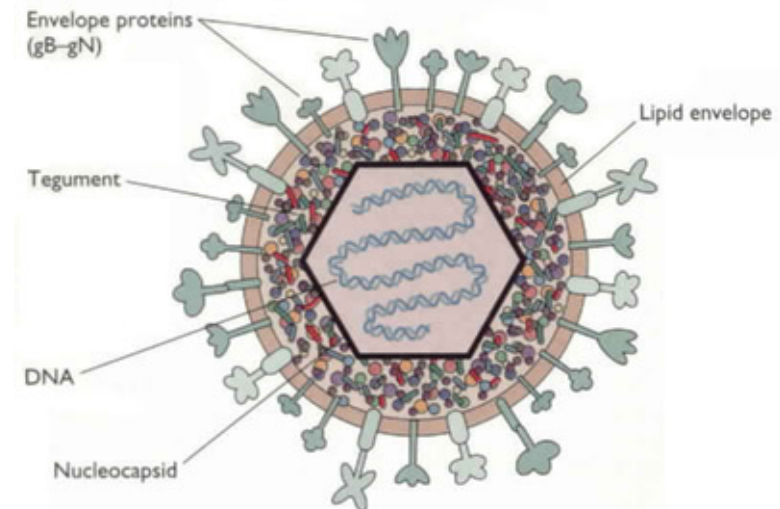


## Transport de **HSV1**: entrée dans et sortie de la cellule

L'identification de la protéine d'Adénovirus liant directement la Dynéine a été "facilitée" par le nombre limité de protéines candidates au sein du virion.

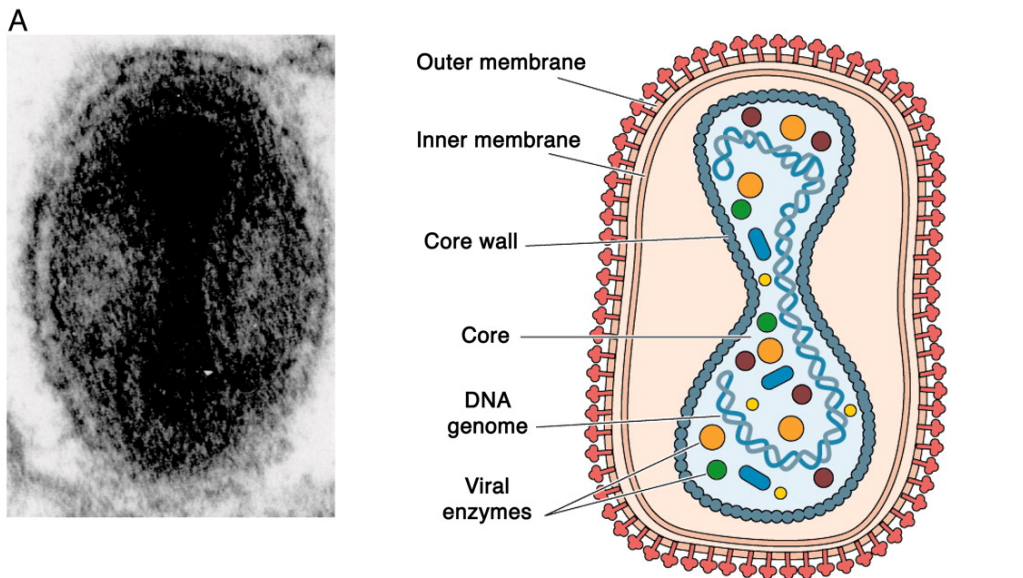
Identification plus difficile pour les **Herpes virus** du fait de la multiplicité de protéines tégmentaires (HSV1: 8 protéines de capside et 26 protéines tégmentaires (Radtke K et coll. 2010. PLoS Pathog.) VP1/2 (UL36) et UL37 sont les deux candidates protéines à assurer la liaison à la Dynéine. Biochimie très complexe.

Pas de donnée claire sur l'interaction avec la Kinésine-1 pour le transport antérograde et la sortie cellulaire, même si plusieurs protéines de capside et de tégment semblent capables de lier ce moteur.

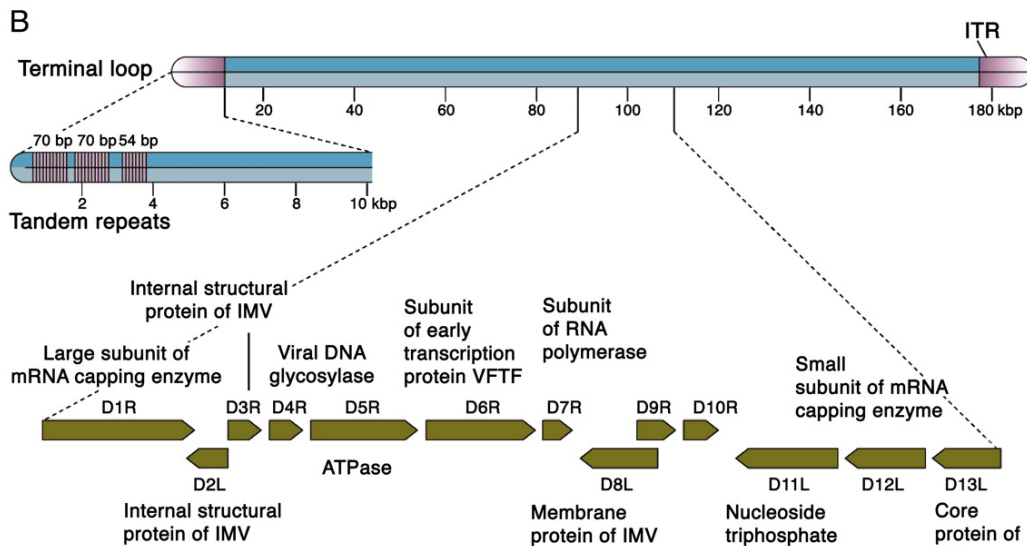


Très peu de données en général sur l'interaction virion-Kinésine-1, sauf VV

# Virus de la Vaccine (VV)



IMV =  
Intracellular mature virion



Griffiths G et coll. 2001. J. Virol  
Smith GL et coll. 2003. Ann. Rev. Microbiol.  
Harrison SC et coll. 2004. PNAS



# Virus de la Vaccine

IV = immature virion  
IMV = intracellular mature virion  
IEV = intracellular enveloped virion  
CEV = cell-associated enveloped virion  
EEV = extracellular enveloped virion

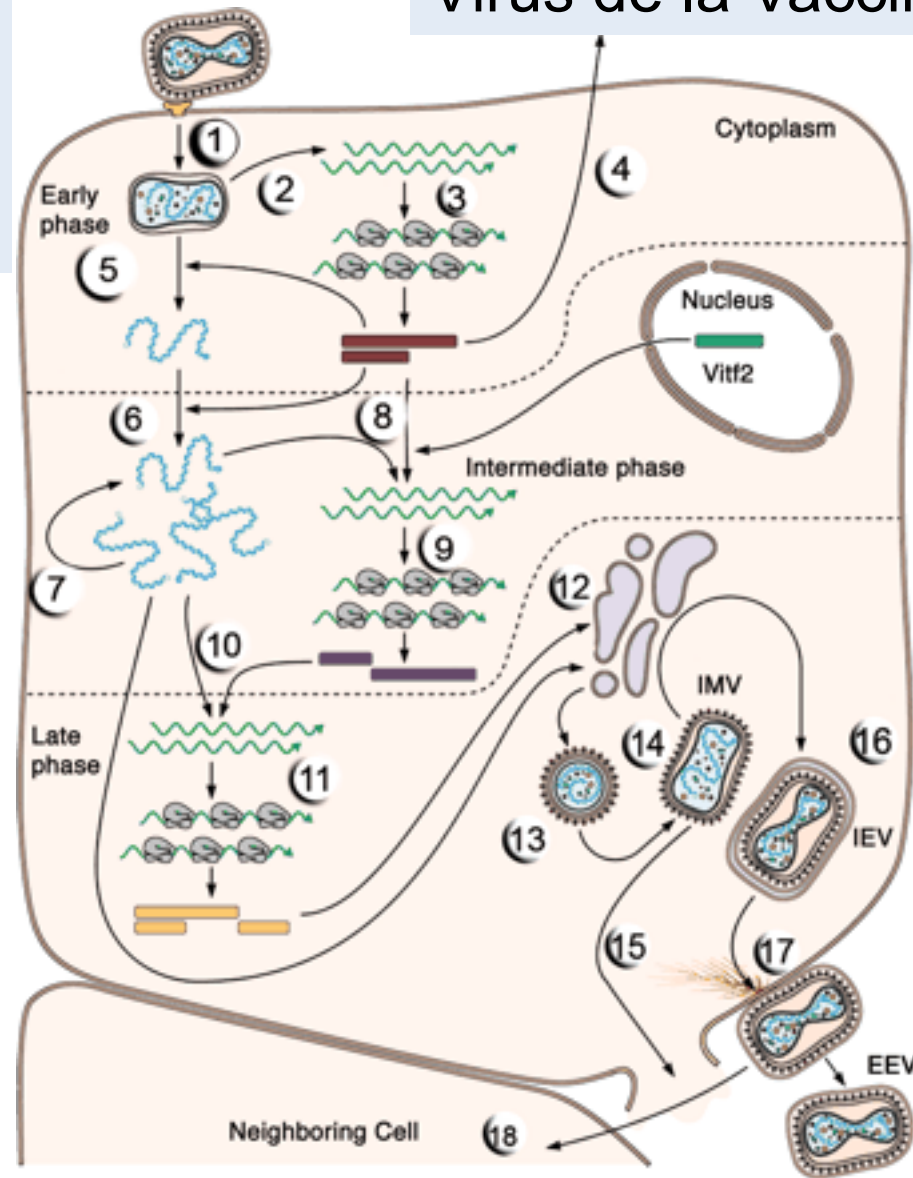
**IV:** assemblage initial. Sphérique, membrane acquise du Golgi ?

**IMV:** virion plus mature, en forme de brique, ayant une double membrane, infectieux en cas de lyse cellulaire

**IEV:** virion entouré d'une seconde double membrane acquise du trans-Golgi ou du réticulum endoplasmique. migre sur des microtubules vers la surface cellulaire.

**CEV:** après fusion avec la membrane cytoplasmique, induit la polymérisation de l'actine sous membranaire, formant des comètes propulsant le CEV vers d'autres cellules.

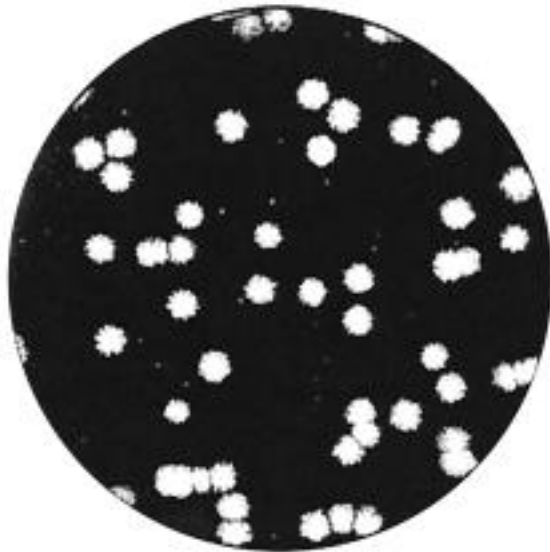
**EEV:** le virion détaché de la surface cellulaire peut infecter d'autres cellules.





Phénotype de base pour l'étude de la pathogénicité  
du virus de la vaccine (VV)

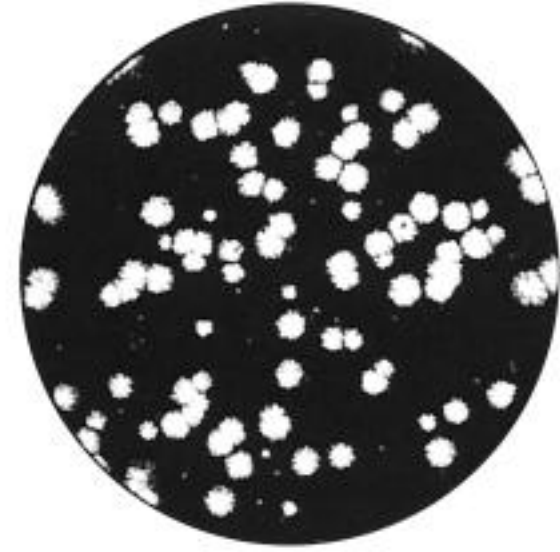
**vF12L**



**v $\Delta$ F12L**



**vF12L-rev**



**Plages de lyse:**

Souche sauvage de VV

Délétion gène F12L

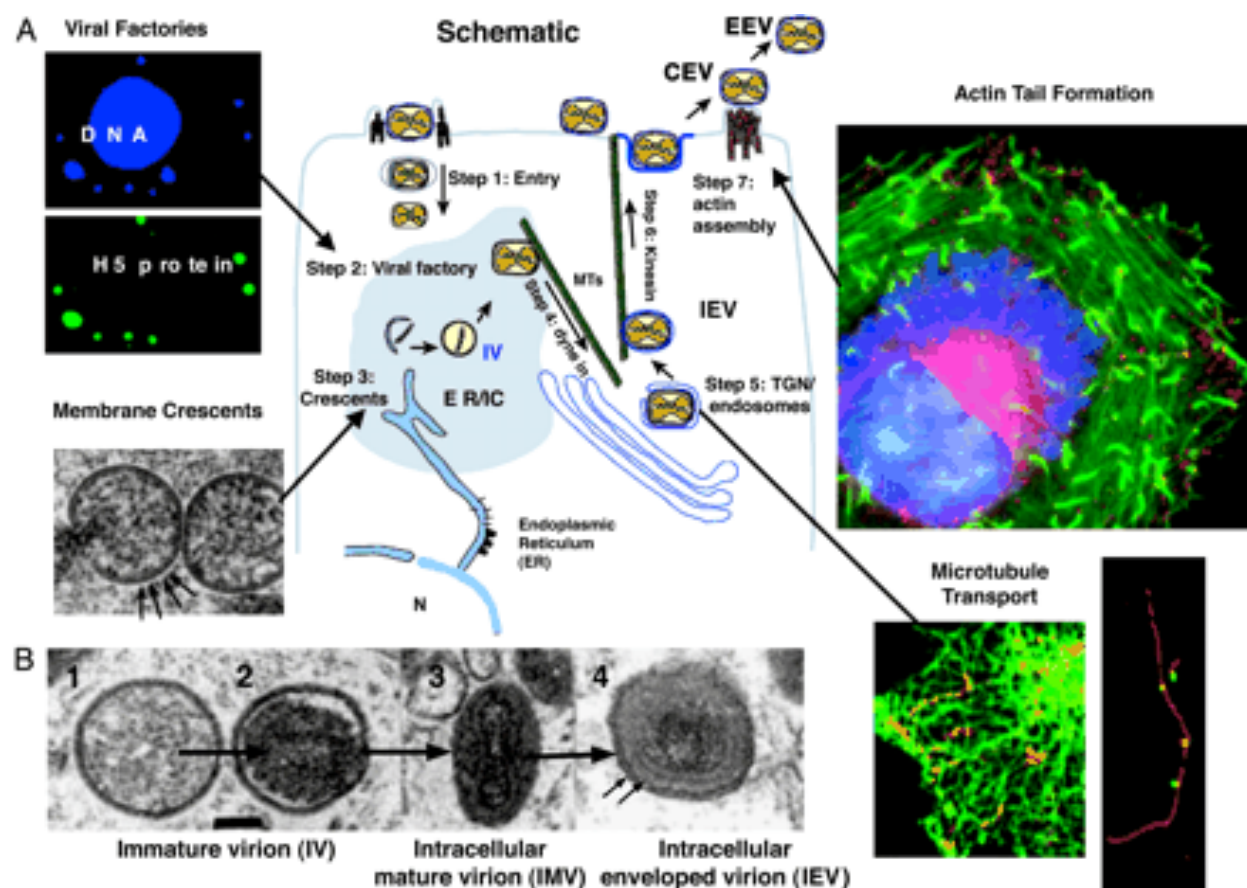
Virus révertant

# Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus

Jens Rietdorf\*, Aspasia Ploubidou\*, Inge Reckmann, Anna Holmström, Friedrich Frischknecht, Markus Zettl, Timo Zimmermann and Michael Way†#

*European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany*

NATURE CELL BIOLOGY | VOL 3 | NOVEMBER 2001



## Virus de la vaccine (VV), mouvement antérograde, accès à la membrane cytoplasmique

### **Mouvement antérograde:**

La Kinésine-1 a un rôle important dans la réplication/dissémination du VV

(Schepis A et coll. 2007. Cell. Microbiol.)

La seule étape où ce rôle a été validé est l'étape de "sortie de la région périnucléaire-transport antérograde vers la membrane cellulaire" (Roberts KL & Smith GL. 2008.

Trends Microbiol.; Ward BM. 2011. Virology)

IEV (doublement enveloppés) recrutent Kinésine-1 et migrent de façon antérograde le long des microtubules.

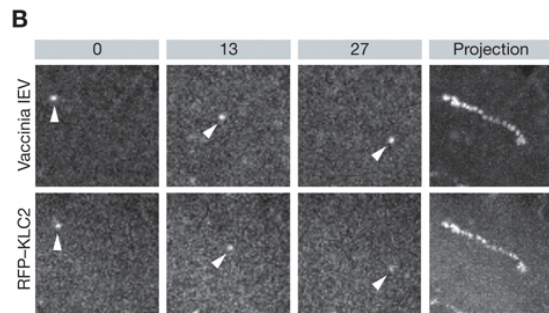
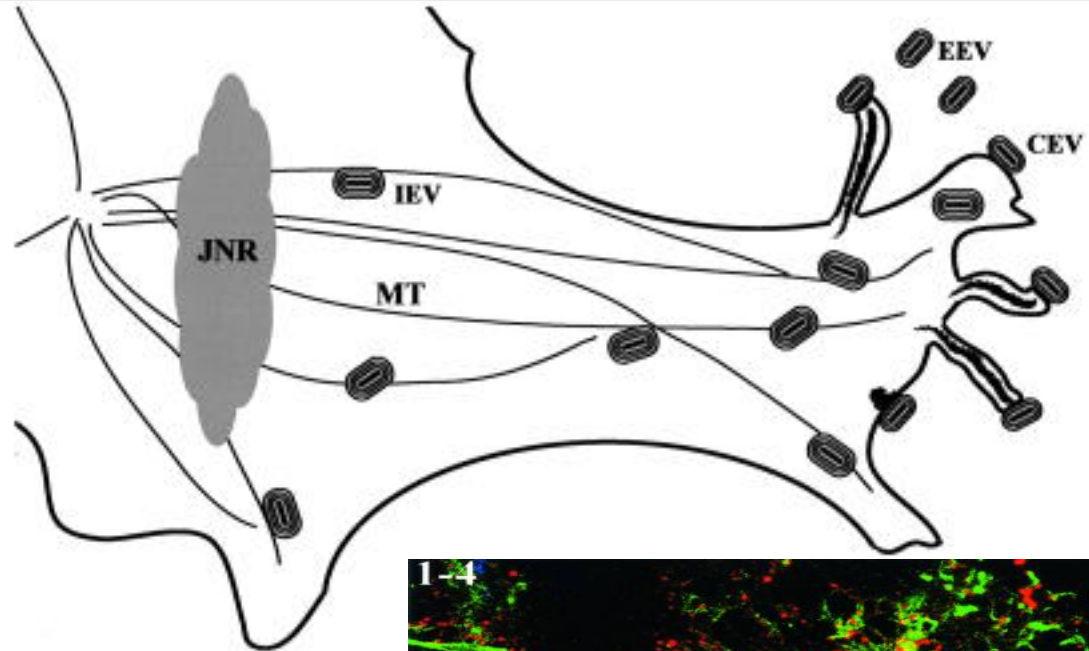
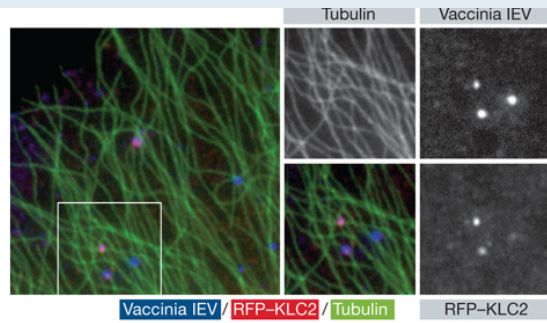
Ce recrutement nécessite **A36**, une protéine transmembranaire intégrale de IEV. En absence de A36, les IEV demeurent groupés dans la région périnucléaire (Ward KB & Moss B. 2001. J. Virol). Phénotype "petites plages de lyse" sur cellules en culture.

Les AA 81-111 de A36 interagissent directement avec les séquences de liaison des charges transportées (TPR) de KLC (Kinesine-1 light chain) (Ward BM & Moss B. 2004. J. Virol.).

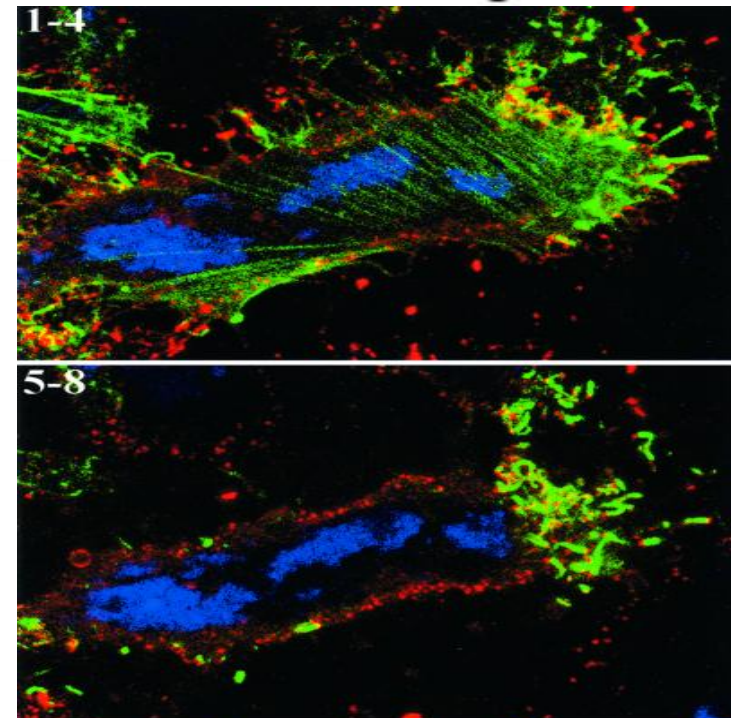
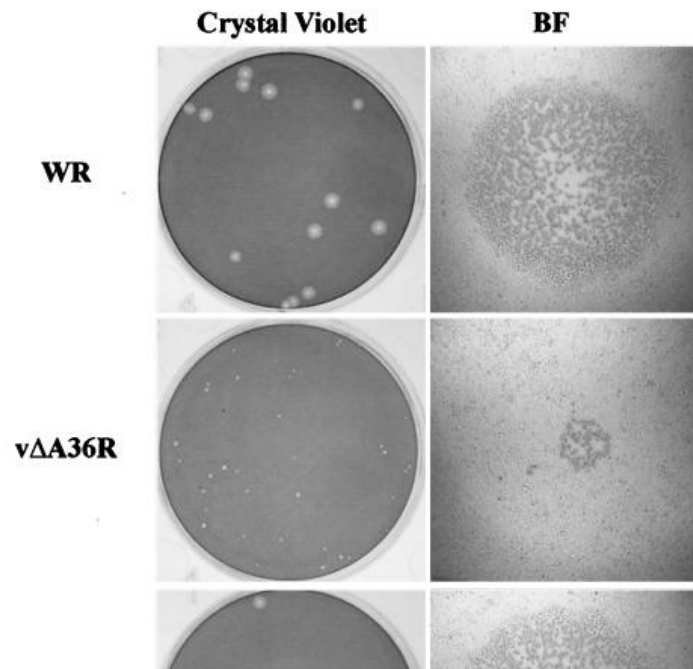
La protéine F12 a aussi un rôle direct dans le transport microtubule-dépendant des IEV vers la membrane cytoplasmique. La perte de L12 entraîne aussi une agglutination des virions dans la région périnucléaire (Zhang WH et coll. 2000. J. Virol.; van EijlH et coll. 2002. J. Gen. Virol.; Dodding MP et coll. 2009. Cell. Microbiol.).

F12 se lie à A36 mais pourrait aussi se lier à Kinésine-1 (Morgan GW et coll. 2010. PLoS Pathog.)

# Transition mouvement antérograde (microtubules) – sortie/dissémination (actine)



Dodding & Way, 2011



Ward & Moss, 2001



## Manipulation du cytosquelette d'actine par VV

IEV, après son assemblage doit être transporté vers la membrane cytoplasmique.

Nécessite une subversion des microtubules utilisés pour la migration centrifuge du virus (- vers +) et du cytosquelette d'actine, en particulier pour désassembler le cytosquelette d'actine sous-cortical et atteindre la membrane cytoplasmique pour y fusionner.

**F11** (codée par le gène *F11L*) bloque le cycle du GTP des GTPases de la famille Rho en se liant à RhoA (Valderamma F et coll. 2006. Science). Ceci bloque l'interaction Avec la kinase ROCK et la formine mDIA). Résultat = perte des cables de stress d'actine. Mutant *F11L*: accumulation sous la membrane plasmique (Arakawa Y et coll. 2007. Cell Host & Microbe)

Les virions sous forme CEV s'éloignent de la cellule en tête d'une protrusion correspondant à une "comète" d'actine (Hiller G et coll. 1979. Virology). Cette "comète" fut ensuite démontrée correspondre à une polymérisation de l'actine (Cudmore S et coll. 1995. Nature), comme démontré antérieurement chez *Shigella* (Bernardini et coll. 1989. PNAS) et *Listeria* (Portnoy D et coll. 1989. J. Cell Biol.).

La protéine virale **A36** est une protéine membranaire intégrale de l'enveloppe externe de CEV qui va rester localisée sous la membrane plasmique apposée au virion.

A36 est phosphorylée par c-Src. A36 tyrosine-phosphorylée recrute Lck et Grb-2, puis N-WASP et WIP qui recrutent et activent le complexe Arp2/3 aboutissant à la nucléation / polymérisation de l'actine et à la formation de la "comète".

(Wolffe EJ et coll. 1998. Virology; Frischknecht F et coll. 1999. Nature; Scaplehorn N et coll. 2002. Curr. Biol.)



Une énigme dans ce domaine:

La progression des plages de lyse de monocouches infectées par VV est plus rapide que ne le laisse prévoir la durée du cycle du virus dans une cellule.

Cette énigme a été récemment résolue.

Les cellules infectées expriment A36 qui exerce un effet répulsif sur les CEV et EEV qui ne peuvent envahir efficacement les cellules (superinfection bloquée). Les virions sont donc portés par la polymérisation de l'actine, formant de nouveaux foyers infectieux à distance du foyer index.

(Doceul V et coll. 2010. Science)

