Le virus de la rage induit la formation de granules de stress en contact étroit avec les usines virales

Jovan Nikolic, Danielle Blondel

Institut intégratif de la cellule (I2BC), CEA, CNRS, université Paris-sud, université Paris-Saclay, Avenue de la Terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette Cedex, France.

jovan.nikolic@curie.fr

danielle.blondel@i2bc.paris-saclay.fr

> La rage est une zoonose virale qui induit des dysfonctionnements neuro-naux. Elle est à l'origine d'environ 59 000 décès annuels dans le monde [1] (→). Des écrits datant de l'antiquité relatent les symptômes de cette maladie. Le virus qui infecte les mammifères, animaux sauvages et domestiques, provoque une encéphalomyélite dont l'issue est toujours fatale. Le virus de la rage appartient à la famille des rhabdovirus et à l'ordre des *Mononegavirales*, un ordre qui regroupe les virus possédant comme génome une molécule d'ARN simple brin de polarité négative, complémentaire des ARN messagers. Plusieurs virus pathogènes humains, comme le virus Ébola ou le virus de la rougeole, appartiennent à cet ordre [2] (→).

(→) Voir la Synthèse de F. Ribadeau-Dumas et al., *m/s* n° 1, janvier 2013, page 47

(→) Voir la Synthèse de D. Malvy et al., *m/s* n° 10, octobre 2017, page 891

Compartimentation cellulaire viro-induite : les usines virales du virus de la rage

Au cours de l'infection rabique, des inclusions caractéristiques apparaissent dans le cytoplasme des cellules infectées. Décrites dès 1903 par le microbiologiste italien Adelchi Negri, elles furent dénommées corps de Negri (CN). Les CN ont été utilisés comme outil de diagnostic *post-mortem* lors d'encéphalites mortelles, étant spécifiques de l'infection et identifiables par des méthodes de coloration histo-chimiques

simples. Leur fonction au cours du cycle viral n'a cependant été déterminée qu'en 2009, dans notre laboratoire [3]. La machinerie de réplication virale, constituée de la polymérase virale (L), de son cofacteur, la phosphoprotéine (P), de la nucléoprotéine (N), et les ARN viraux (messagers, génomiques et anti-génomiques) sont présents dans ces structures dans lesquelles se déroulent les étapes de transcription et de réplication virales. Les CN sont donc considérés comme les usines virales du virus de la rage. Actuellement, cette notion d'usine virale est communément admise et de nombreux virus induisent la formation de ces structures particulières pour assurer les étapes clefs de leur cycle [4, 5]. Leur nature et leur localisation diffèrent néanmoins selon les virus. Elles permettent de concentrer et de recruter les facteurs viraux et cellulaires nécessaires à la réplication, ou de dissimuler des signaux activateurs de la réponse immunitaire. Elles peuvent également être considérées comme des structures cellulaires, destinées à circonscrire l'infection virale. Mais le virus réussit à détourner cette voie à son avantage pour promouvoir son cycle.

Un deuxième type de compartimentation cellulaire induit par le virus de la rage : les granules de stress

Afin d'explorer les mécanismes impliqués dans la formation des CN, nous avons étudié la possibilité que le virus

de la rage puisse détourner une structure cellulaire pour former ses usines. Nous avons recherché la présence, au sein des CN, de marqueurs de compartiments cellulaires, notamment des granules ARN (comme les *processing bodies* ou granules de stress [GS]). Les granules ARN sont des compartiments composés d'ARN et de protéines, dépourvus de membrane et comparables aux CN [6]. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de co-localisation entre les granules ARN cellulaires et les CN, indiquant ainsi que ces derniers ne correspondent à aucune structure cellulaire connue. En revanche, nous avons observé l'apparition de GS dans le cytoplasme des cellules infectées (Figure 1A) [7]. Les GS sont des structures qui sont impliquées dans la réponse cellulaire au stress. La cellule s'adapte, en effet, afin de supporter les stress qui l'agressent et qui sont de natures variées (stress oxydant, rayons ultraviolet, stress thermique, etc.). L'une des conséquences de ces agressions peut être l'arrêt global de la traduction au profit de la production de certains ARNm (messagers) qui codent des protéines de réponse au stress comme les protéines HSP (*heat shock protein*). Les ARNm réprimés peuvent être dégradés ou stockés jusqu'à la levée du stress. Des structures spécifiques sont impliquées dans ces processus, plus particulièrement les GS, qui concentrent les ARNm en attente de traduction. Leur apparition fait suite au blocage de l'initiation de la traduction, principalement *via* la

Figure 1. Les granules de stress détectés à proximité des corps de Negri dans les cellules infectées par le virus de la rage recrutent les ARN messagers viraux. **A.** Les granules de stress (GS) visualisés par marquage fluorescent (G3BP1 [*Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*] en rouge) sont présents en nombre important dans le cytoplasme des cellules infectées. Les GS sont souvent proches des corps de Negri (CN) qui sont détectés par la phosphoprotéine (P en vert). Les noyaux sont colorés en bleu. L'échelle correspond à 10 μ m. **B.** Reconstruction tridimensionnelle montrant que les GS (rouge) et les CN (vert) sont des structures distinctes mais juxtaposées. On peut aussi visualiser des inclusions de GS à l'intérieur des CN. **C.** Les ARN viraux (marquage magenta par le 5-éthynyl uridine - EU) synthétisés dans les CN (vert) sont ensuite recrutés dans les GS (rouge). **D.** Schéma récapitulatif des caractéristiques des GS et la localisation des ARN viraux.

phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α [8]. L'inhibition générale de la traduction est un moyen, pour la cellule, de lutter contre les infections virales, et l'apparition de GS a été observée en réponse à différentes infections. Certains virus sont capables d'inhiber la formation de ces granules, d'autres les détournent à leur profit [9]. Dans la majorité des cas, l'induction des GS est transitoire et des mécanismes d'échappement ont été développés par les virus. Plusieurs souches de virus rabique peuvent induire la formation de GS dans

différents types cellulaires, notamment au cours de l'infection de cultures de neurones primaires. Dès 8 h après l'infection, les GS apparaissent dans un faible pourcentage de cellules. La quasi-totalité des cellules deviennent positives pour les GS 24 h après l'infection. Tous les marqueurs conventionnels des GS - TIA-1 (*T-cell intracellular antigen 1*), G3BP1 (*Ras-GTPase-activating protein-binding protein 1*), PABP (*poly[A]-binding protein*) - sont présents dans les granules induits par le virus, indiquant qu'il s'agit vraisemblablement de GS canoniques.

Les granules de stress sont très dynamiques et intimement liés aux corps de Negri

Des expériences de vidéo-microscopie en temps réel réalisées sur des cellules infectées ont montré que les GS induits par le virus de la rage sont des structures dynamiques. Leur taille augmente grâce à des événements de fusion, et ils se concentrent à proximité des usines virales [7]. Les GS subissent des cycles d'assemblage/désassemblage et la fraction de cellules infectées qui en présentent est en fait le résultat d'un équilibre dynamique entre leur formation et leur disparition.

Une reconstruction tridimensionnelle d'une cellule infectée, réalisée à partir d'images obtenues par microscopie confocale, a montré que les GS et les CN sont deux structures distinctes mais qui sont intimement liées. Il est en effet possible de visualiser des inclusions de GS au sein des usines virales (Figure 1B). En raison de cette grande proximité, nous avons recherché s'il existait des échanges de matériels entre les deux structures. Un marquage métabolique court, à l'aide d'un analogue de nucléotide (5-éthynyl uridine - EU), suivi d'une « chasse », a montré que les ARN viraux, synthétisés dans les CN, s'accumulent ensuite dans les GS (Figure 1C). La nature des ARN viraux présents dans les GS a été précisée par la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (*fluorescent in situ hybridation* - FISH) : les ARNm viraux sont présents dans les CN et les GS, alors que les ARN génomiques restent strictement localisés dans les usines virales (Figure 1D) [7]. L'ensemble de ces données révèle ainsi l'existence d'un transport spécifique d'ARN viraux entre les CN et les GS, et d'une connexion entre les deux compartiments.

Rôle antiviral des GS

Le recrutement des ARNm viraux dans les GS suggère qu'ils pourraient avoir un rôle dans la réponse antivirale. Les ARN présents dans ces structures sont