

LA MULTIPLICATION DES VIRUS

Les virus ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule-hôte. Ce sont **des parasites intracellulaires stricts** ils utilisent le système producteur d'énergie (ATP), les ARN de transfert et les ribosomes de la cellule ainsi que toutes les petites molécules nécessaires à leur multiplication.

Après pénétration dans la cellule, le virus apporte seulement **l'information génétique** nécessaire à la fabrication des molécules qui le constituent. Il est d'abord **répliqué** en nouveaux génomes qui sont ensuite **transcrits en ARN-messagers**, eux-mêmes traduits en protéines de structure. Ces macromolécules **s'assemblent** pour former de nouveaux virions qui sont libérés dans le milieu extérieur.

Le virus doit détourner à son profit les voies métaboliques de la cellule **en diminuant** plus ou moins complètement **les synthèses cellulaires** : ainsi, certaines protéines virales peuvent **inhiber la transcription** et **empêcher la traduction des ARN messagers cellulaires**.

1. La multiplication des virus dans les laboratoires

1.1. Culture sur animaux

Ces cultures ont été les premières utilisées à la suite des travaux de Pasteur sur la rage (culture par inoculation dans le cerveau du lapin trépané).

Elles n'ont plus que **des indications limitées** : étude de la transmission des virus (viroses dont on ignore le réservoir de virus) ; vérification de l'innocuité et de l'efficacité d'un nouveau vaccin, préparation de vaccins contre la rage dans les pays en voie de développement.

1.2. Culture sur œufs de poules embryonnés

Cette technique est en voie d'abandon dans les laboratoires. Elle est toujours utilisée par l'industrie pharmaceutique pour **la préparation du vaccin antigrippal** : Le vaccin antigrippal est préparé chaque année à partir des souches de virus recommandées par l'OMS. Ces souches sont inoculées dans l'œuf embryonné, les virus produits sont isolés par ultracentrifugation et inactivés par la bêta-propiolactone.

1.3. Cultures cellulaires

En 1949, Enders réalise la première culture d'un virus - le virus poliomyélique - sur **culture cellulaire *in vitro***. On pratique ces cultures dans des récipients de verre, des boîtes de Pétri en plastique et, dans l'industrie, sur des billes microporteuses.



Trois types de cultures cellulaires sont utilisées :

- les cultures primaires
- les cultures de cellules diploïdes
- les cultures de cellules en lignée continue

a) Les cultures primaires

Les cellules sont issues directement du tissu d'origine, par exemple le rein d'un singe rhésus (seule technique utilisable en 1954 pour la préparation des vaccins antipoliomyélitiques, des milliers de singes rhésus ont été sacrifiés ! (À l'Institut Mérieux on a utilisé 20 000 singes ..)).

Pour respecter les écosystèmes, les cultures primaires sont de moins en moins utilisées, chaque culture nécessitant la mort d'un animal.

b) Les cellules diploïdes

On a isolé de cultures primaires des lignées conservant les caractères de cellules normales et supportant une cinquantaine de passages. On a isolé des souches diploïdes animales ou humaines, telles que la lignée WI38 (Wistar Institut) et la lignée MCR5, originaires de cellules de poumon embryonnaire humain

c) Les cellules en lignée continue

Il arrive parfois que certaines cellules d'une culture se modifient croissance plus rapide, anomalies chromosomiques, perte de l'inhibition de contact et surtout possibilité d'un nombre **illimité** de passages.

De telles cellules "transformées" *in vivo* donnent naissance à des lignées continues, immortelles :

- **les cellules Vero** ont été isolées d'une culture primaire de rein de singe vert (Vervet origin)
- **les cellules Hela**, isolées en 1952 du carcinome du col utérin d'une patiente américaine (Helen Lansing),
- **les cellules KB**, isolées d'un cancer buccal.

Les cultures cellulaires sont utilisées non seulement dans **les laboratoires de recherche** mais également dans **les laboratoires d'analyse** (pour identifier certains virus) et dans **l'industrie pharmaceutique** (pour la préparation des vaccins, la lignée Vero est de plus en plus utilisée)

2. Aspects cellulaires de la multiplication virale

L'expression du génome viral dans la cellule infectée aboutit à des altérations cellulaires diverses définissant plusieurs types d'interactions virus - cellules :

2.1. Le cycle productif

C'est le cycle de multiplication il aboutit à la production de nouveaux virions. Comme il se termine par la mort de la cellule infectée (à plus ou moins brève échéance) on l'appelle aussi **le cycle lytique**. La cellule infectée dans laquelle le virus se multiplie est une cellule **permissive**. La permissivité d'une cellule dépend de la présence de **cofacteurs cellulaires**, capables d'aider l'expression du génome viral et la fabrication de particules virales.

Dans la cellule infectée

- l'inhibition des synthèses cellulaires,
- la fragmentation de la chromatine par des enzymes virales,
- l'accumulation des macromolécules virales,

conduisent à **des lésions observables au microscope optique** et qui sont souvent évocatrices du virus.

C'est **l'effet cytopathogène** (ou ECP)

- la nappe cellulaire est détruite,
- les cellules sont ballonnées ou au contraire rétractées,
- avec certains virus **la fusion** des cellules forme des nappes cytoplasmiques contenant de nombreux noyaux : les **syncytiums**
- après coloration des cellules on peut aussi voir **des inclusions** dans le noyau ou dans le cytoplasme, selon le site où le virus se multiplie.

2.2. Le cycle abortif

Bien qu'ayant pénétré dans la cellule, le génome ne peut pas s'exprimer : les cellules sont **des cellules non permissives** : elles sont incapables d'assurer entièrement le programme des synthèses virales.

2.3. La transformation cellulaire

En pénétrant dans une cellule non permissive, le virus ne peut pas se multiplier. Mais son génome peut subsister **sous la forme d'un épisome** : libre ou **intégré dans le génome cellulaire**.

L'expression de certains gènes viraux ne provoque pas la mort des cellules mais leur donne des propriétés de croissance et d'immortalité analogues à celles des cellules cancéreuses. Le virus a transformé la cellule : c'est **un virus oncogène**.

2.4. Les infections virales persistantes

Les infections virales persistantes sont de deux types : **latentes** ou **chroniques**.

a) l'infection latente

Dans les infections virales latentes, la primo-infection aiguë guérit. Ensuite, **aucune particule virale** infectieuse ne peut être isolée bien que le virus soit encore présent dans l'organisme. Mais, sous l'influence de divers **stimuli**, le virus "caché" peut entrer dans une phase de **réactivation** et des particules virales infectieuses sont produites.

- les *Herpesvirus* sont responsables d'infections virales latentes.

Une personne ayant une infection latente n'est contagieuse qu'au cours des périodes de réactivation.

b) l'infection chronique

Une infection chronique est caractérisée par la présence **continue** de virus, notamment dans le Sang.

- le virus de l'immunodéficience humaine, le VIH, engendre une infection chronique. Le virus est présent, notamment dans le sang, de la primo-infection jusqu'aux stades avancés de la maladie.
- chez 5 % des personnes infectées le virus de l'hépatite B persiste : il est alors responsable d'une infection chronique.

Une personne ayant une infection chronique peut transmettre le virus en permanence.

3. Le cycle de multiplication

Quel que soit le virus, le cycle de multiplication - dans ses grandes lignes - s'effectue en plusieurs étapes :

- 1 fixation
- 2 pénétration
- 3 décapsidation

expression du génome :

=> *enzymes*

- 4 réplication du génome

expression des génomes :

=> *protéines de capsides et d'enveloppe*

- 5 assemblage des nucléocapsides

- 6 libération des virions

Cette période du cycle correspond aux synthèses : on l'appelle la phase d'éclipse car le virus semble avoir « disparu » : il est impossible d'isoler une particule virale.

Le génome viral doit impérativement se faire "remarquer" par la cellule. Pour cette raison, il code souvent **des protéines non structurales** qui ont pour mission de perturber des étapes de la machinerie cellulaire :

- **la réplication de l'ADN cellulaire** : inhibition le plus souvent, parfois activation,
- **la transcription des ARN-messagers cellulaires**, en bloquant leur exportation vers le cytosol,
- **la traduction des ARN-messagers cellulaires** en empêchant la fixation des ribosomes.

3.1. La fixation

C'est l'étape préalable à l'entrée dans la cellule. La fixation des virions **nécessite** l'interaction :
entre **un ligand viral** --> sur le virus

et un récepteur cellulaire --> sur la cellule

Les récepteurs utilisés par les virus sont **souvent des molécules d'adhésion cellulaires**, les CAM (Cell Adhesion Molecule) qui interagissent avec des molécules portées par la membrane plasmique d'autres cellules.

Récepteurs cellulaires utilisés par des virus		
virus	récepteur	fonction physiologique
Poliovirus	1 PVR	Inconnue
Virus du sida (VIH)	2 CD4 (lymphocytes Th, macrophages)	Reconnaît les molécules CMH de classe 2
Rhinovirus	3 ICAM 1	Molécule d'adhésion
Virus d'Epstein-Barr (EBV)	4 CR2 (cellules du pharynx, lymphocytes B)	Récepteur de C3d
Virus de la grippe	5 NANA	Constituant des gangliosides membranaires

Le spectre d'hôte est défini par la ou les espèces animales et par le ou les tissus que le virus peut infecter. Le spectre d'hôte dépend de la présence de **récepteurs cellulaires**.

Quand un virus utilise des récepteurs **ubiquitaires**, présents sur des cellules d'espèces animales différentes, **le spectre d'hôte est large**. Par contre si les récepteurs sont propres à une seule espèce, **le spectre est étroit** c'est ce qui explique que des virus sont spécifiques d'une espèce.

- le **virus de la rage** affecte **tous** les mammifères
- certains virus se développent à **la fois** chez un animal, un insecte vecteur et l'homme (**les arbovirus**)
- certains **virus de la grippe** peuvent affecter à la fois l'homme, les oiseaux migrateurs le porc et le cheval
- d'autres **sont propres à l'espèce humaine** : les virus de la poliomyélite, le virus de la rougeole, le virus de la rubéole.

Le ligand viral

Quand le virus est nu, c'est **une conformation** particulière des protéines de la capsid. Quand un virus est enveloppé ce sont **les glycoprotéines** d'enveloppe.

Le ligand viral des *Adenovirus* correspond à **l'extrémité des fibres** (les "antennes" des douze pentons), il se fixe à **des intégrines** de la membrane cellulaire.



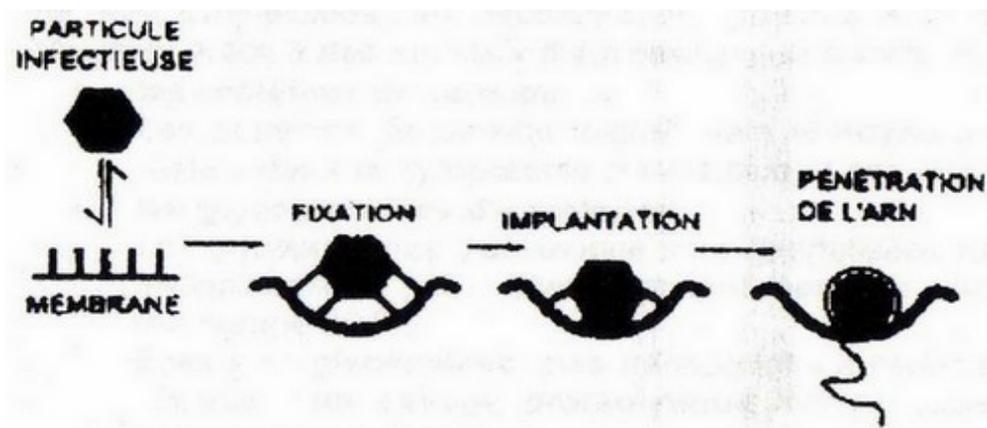
3.2. La pénétration

Selon que le virus **est nu** ou **enveloppé**, plusieurs mécanismes sont possibles :

a) Pénétration directe du génome

Le procédé est peu courant. Il est utilisé par les *Picornavirus* :

- la fixation au récepteur cellulaire déstabilise la capsid fermement attachée à la membrane plasmique
- le génome s'en échappe et pénètre directement dans le cytoplasme

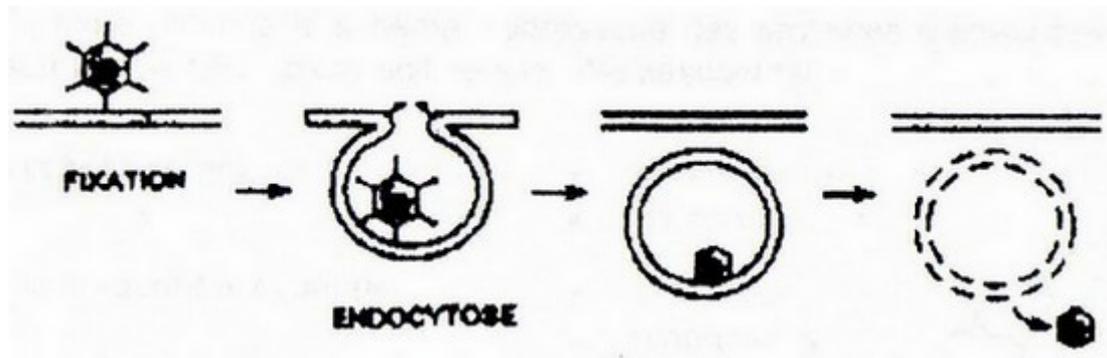


b) Endocytose à récepteur

Ce mécanisme est commun aux virus nus et enveloppés.

Quand un ligand se fixe à son récepteur, il est endocyté. Le virion subit le même traitement :

il n'est pas pour autant dans le cytoplasme mais à **l'intérieur d'une vésicule** dont il doit s'échapper, soit par rupture de l'endosome, soit par fanchissement de la membrane vésiculaire par le génome (cas du virus poliomyélitique).



c) Fusion avec la membrane plasmique

Ce mécanisme est propre aux virus enveloppés car il requiert l'intervention d'une autre glycoprotéine virale : la **protéine de fusion**.

On appelle **récepteur** la structure cellulaire d'attachement primaire et **corécepteur** la structure cellulaire d'attachement secondaire nécessaire pour l'étape de fusion. L'enveloppe fusionne avec la membrane cytoplasmique et libère la nucléocapside dans le cytoplasme.



d) Endocytose à récepteur puis fusion avec la membrane de l'endocyte

Ce mécanisme est également propre aux virus enveloppés.

La fixation du virus aux récepteurs cellulaires déclenche l'endocytose et le virus se retrouve captif dans la vésicule d'endocytose. **L'acidification** du contenu de la vésicule d'endocytose révèle les régions **hydrophobes** des spicules virales qui, en s'implantant dans la membrane vésiculaire, permettent la fusion de l'enveloppe et de la membrane : la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme.

3.3. La décapsidation

C'est une étape indispensable : la capsidie doit se désolidariser du génome viral pour que celui-ci puisse s'exprimer. Cette étape est encore mal connue. On sait seulement que des protéases cellulaires interviennent dans la décapsidation :

- dans le cas des *Picornavirus*, la décapsidation se fait en même temps que la pénétration, puisque la capsidie reste à l'extérieur de la cellule ou dans la vésicule.
- pour la plupart des *virus à ADN*, la nucléocapsidie est prise en charge par une MAP motrice (Microtubule Associated Protein : kinésine, dynéine), liée aux microtubules du cytosquelette cellulaire, qui la transporte vers la membrane nucléaire.
- si le génome a été libéré dans le cytosol, il s'associe à des protéines cellulaires et/ou virales pour être également pris en charge par les MAP motrices et les microtubules.

dans ces deux cas, au moins une des protéines associées au génome viral possède un **signal de localisation nucléaire (NLS)** qui permet la mobilisation des facteurs cytosoliques responsables de l'approche finale de la membrane nucléaire et de l'entrée du complexe nucléoprotéique dans le nucléoplasme au travers d'un pore nucléaire

- chez certains virus la décapsidation **est partielle**

Les *Reovirus* possèdent une double capsidie et seule la capsidie externe est détruite.

Une fois décapsidé, le virus a cessé d'exister en tant que particule organisée : on ne voit plus de virion, il s'est éclipse. L'éclipse commence.

Ces 3 étapes, fixation, pénétration, et décapsidation **échouent très souvent** pour plusieurs raisons :

- **fixation** sans endocytose ou sans fusion
- **endocytose** sans libération de la nucléocapside
- **destruction du génome** viral par des nucléases.

Mais **une** cellule possède, selon les récepteurs, de **10.000 à 500.000** récepteurs, ce qui permet de comprendre :

- 1 que de nombreuses particules virales peuvent se fixer à une cellule,
- 2 et que, par conséquent, de nombreux génomes sont introduits à l'intérieur de la cellule infectée.

3.4. L'éclipse

Malgré son nom, la phase d'éclipse correspond à la **multiplication virale** proprement dite. Quel que soit le virus, la multiplication se fait en **deux étapes** plus ou moins distinctes :

1 la réplication **du génome**

2 la **transcription des nouveaux génomes** en ARN-messagers dont la traduction assure la formation **des protéines** nécessaires à la construction de la **capside** et de l'**enveloppe**.

Cette multiplication s'accompagne le plus souvent d'**une inhibition** des fonctions cellulaires.

a) Les virus à ADN (transcription et réplication dans le noyau)

Pour ces virus, une première transcription conduit à la synthèse de protéines dites **précoces**, qui interviennent en particulier dans la réplication du génome viral. En général, les protéines précoces ne sont pas incorporées dans les futurs virions, ce sont **des protéines non structurales**, intervenant dans la réplication du génome.

Le génome est répliqué. Puis, une transcription de ces répliques conduit à la synthèse des protéines **tardives** : ce sont les **protéines de structure**, c'est à dire les protéines de capsidite et d'enveloppe.

b) Les virus à ARN (transcription et réplication dans le cytoplasme)

Le processus diffère selon la nature de l'ARN génomique :

- **s'il s'agit d'un ARN +**, il se comporte comme un ARN-messager et il est immédiatement traduit en protéines. Parmi ces protéines, **une réplicase** permettra la synthèse de l'ARN **complémentaire** (ARN -) qui servira de **matrice** pour la synthèse des nouveaux génomes. C'est à partir de ces nouveaux génomes que les protéines de structure sont synthétisées.

- **s'il s'agit d'un ARN -**, il ne peut être traduit directement par les ribosomes et doit donc être préalablement transcrit en ARN-messagers par **une transcriptase virale** associée au génome.

Le voyage des protéines de structure

Une fois synthétisées, les protéines de structure sont acheminées vers les régions cellulaires adéquates grâce à **des signaux d'adressage** - une sorte de code postal :

• les protéines de capsidite

Les protéines de capsidite migrent vers le **noyau** pour la plupart des virus à ADN et restent **dans le cytoplasme** pour la plupart des virus à ARN.

• les glycoprotéines d'enveloppe

Les glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées par les ribosomes liés au réticulum endoplasmique (RE). Elles sont **insérées**, par une séquence hydrophobe, dans la membrane du RE. Elles sont **glycosylées**, puis transportées à l'appareil de Golgi où certaines subissent **un clivage protéolytique** indispensable à leurs fonctions (virus de la grippe, virus du Sida).

Une vésicule les achemine enfin vers une membrane cellulaire. La vésicule **fusionne** avec la membrane.

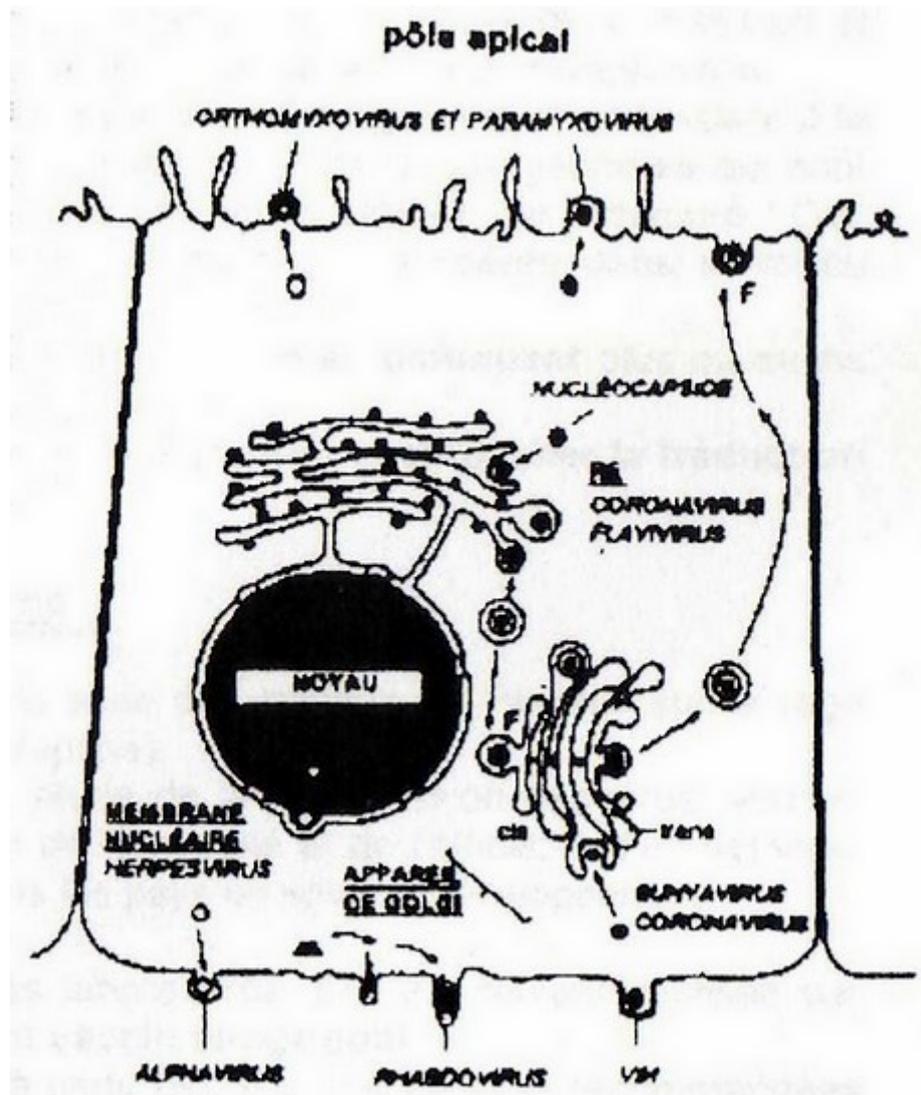
• la protéine de matrice

Va s'apposer sur la **face interne** de la membrane.

3.5. L'assemblage

La phase d'assemblage marque la fin de la période d'éclipse commencée avec la décapsidation. Les protéines de capsidite s'assemblent autour des nouveaux génomes, ou forment **une procapsidite** perméable à l'acide nucléique génomique, le plus souvent par un processus **d'auto-assemblage**.

Comme l'indique le schéma, l'adressage des protéines d'enveloppe et de matrice est remarquable soit vers le pôle apical, soit vers le pôle basolatéral.



- ⇒ La bordure apicale :
 - Orthomyxovirus
 - Paramyxovirus
- ⇒ La bordure basolatérale :
 - Alphavirus
 - Rhabdovirus
 - Lentivirus (virus du sida)
- ⇒ Membrane nucléaire
 - Herpesvirus
- ⇒ La lumière du RE
 - Coronavirus
 - Flavivirus
- ⇒ L'appareil de Golgi
 - Coronavirus
 - Bunyavirus

(F = fusion de la membrane vésiculaire, soit avec l'appareil de Golgi, soit avec la membrane plasmique)

3.6. Libération

Les virions assemblés quittent la cellule selon trois modalités :

a) Lyse de la cellule : les virus nus

L'assemblage a lieu dans le cytoplasme (*Picornavirus*, *Reovirus*) ou dans le noyau (*Adenovirus*, *Papovavirus*, *Parvovirus*).

La libération des virions dépend totalement de **la lyse cellulaire**.

b) Le bourgeonnement : les virus enveloppés

C'est le mode habituel de sortie des virus enveloppés : assemblage et libération sont étroitement Associés. Le bourgeonnement des nucléocapsides a lieu au niveau des membranes modifiées, ce qui indique des interactions spécifiques entre la nucléocapside et les protéines d'enveloppe (spicules ou protéines de matrice). Une fois libérées, des phénomènes de **maturation** sont souvent nécessaires pour que les particules deviennent infectieuses.

c) Transport : les *Herpesvirus*

Le nucléocapside des *Herpesvirus* est assemblée dans le noyau. Le virus acquiert son enveloppe par bourgeonnement à **travers la membrane nucléaire** et se retrouve dans la lumière du réticulum endoplasmique.

Les *Herpesvirus* assemblés s'accumulent entre les membranes nucléaires ou dans le réticulum endoplasmique. Enveloppés dans des vésicules ils sont enfin transportés du noyau vers la membrane cytoplasmique. La fusion des membranes vésiculaire et cytoplasmique libère les particules virales à l'extérieur.

Le bourgeonnement n'implique pas la destruction de la cellule. Certains virus enveloppés sont **peu cytotocides** (ainsi le virus de la rage), et la libération des virions se poursuit pendant d'assez longues périodes.