La macroautophagie limite l'induction précoce de l'interféron-β durant l'infection par le virus de la grippe A

Brieuc Perot, Jeremy Boussier, Molly A Ingersoll

▶ **To cite this version:**

Brieuc Perot, Jeremy Boussier, Molly A Ingersoll. La macroautophagie limite l'induction précoce de l'interféron-β durant l'infection par le virus de la grippe A. Médecine/Sciences, 2018, 34 (12), pp.1035-1038. 10.1051/medsci/2018289 . pasteur-02024947

HAL Id: pasteur-02024947

https://pasteur.hal.science/pasteur-02024947

Submitted on 19 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

La macroautophagie limite l'induction précoce de l'interféron-β durant l'infection par le virus de la grippe A

Brieuc P. Perot[1-3], Jeremy Boussier[1,2,4], Molly A. Ingersoll[1,2]

[1]Laboratoire : immunobiologie des cellules dendritiques, département d'immunologie, Institut Pasteur, Paris France
[2]Inserm U1223, Paris, France
[3]École doctorale physiologie, physiopathologie et thérapeutique, université Pierre et Marie Curie (université Paris 6), Paris, France
[4]École doctorale « frontières du vivant », Université Paris Diderot, Paris, France
brieuc.perot@inserm.fr

› Le virus de la grippe A, ou virus influenza de type A (VIA), qui appartient à la famille des *Orthomyxoviridae*, cause des épidémies annuelles et des pandémies sporadiques qui en font un problème majeur de santé publique [1]. La grippe entraîne des symptômes locaux et systémiques de sévérité variable et peut être mortelle. Bien que la réponse immunitaire innée de l'hôte permette un contrôle précoce de la réplication virale, la sévérité des symptômes est liée à sa suractivation à l'origine notamment d'une hypercytokinémie[1] [1]. Comprendre les mécanismes d'induction et de régulation de la réponse immunitaire innée au cours de l'infection est donc essentiel pour lutter efficacement contre la grippe.

Le VIA est un virus enveloppé, dont le génome est segmenté en 8 ARN simple brin à polarité négative codant chacun une ou plusieurs protéines [1]. La réplication des ARN viraux s'effectue dans le noyau de la cellule infectée. Le VIA est détecté par les cellules de l'hôte par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes. Dans les cellules infectées, le principal et le plus ubiquitaire de ces récepteurs permettant la détection de la présence du virus, RIG-I (*retinoic acid-inducible gene I*), s'active en présence d'ARN 5'-triphosphate, un motif moléculaire associé à certains virus, dont le VIA [1].

L'activation de RIG-I permet, par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice mitochondriale MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*), d'activer les facteurs de transcription NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) et IRF-3/IRF-7 (*interferon regulatory factor 3/7*) qui, à leur tour, induisent l'expression de cytokines inflammatoires telles que les interférons (IFN) de type I, cytokines clés de la réponse immunitaire antivirale innée [1]. Face à cette réponse, le VIA est capable de limiter l'activation de RIG-I dans les cellules qu'il infecte, principalement *via* l'action de sa protéine non structurale 1 (NS1) [1, 2].

L'infection par le VIA perturbe les voies métaboliques de la cellule hôte et notamment la macroautophagie (par la suite désignée « autophagie ») (➜).

(➜) Voir le numéro thématique *Autophagie*, m/s n° 3, mars 2017

L'autophagie est une voie du catabolisme cellulaire qui dégrade les éléments cytoplasmiques tels que les organites endommagés et les agrégats protéiques après leur isolement au sein de vésicules à double membrane. Ces vésicules, appelées autophagosomes, fusionnent après leur formation avec les lysosomes selon un processus de maturation qui conduit à la dégradation enzymatique de leur contenu [3]. En réponse à un stress cellulaire (par exemple le manque en nutriments), l'autophagie agit comme un mécanisme de survie cellulaire en permettant notamment la production de nouveaux nutriments à partir du contenu vésiculaire. De nombreux virus distants du point de vue de leur évolution perturbent l'activité autophagique des cellules qu'ils infectent [3]. En particulier, le VIA stimule l'autophagie. Cependant, sa protéine de matrice 2 (M2) interfère avec l'étape de maturation des autophagosomes [4]. Si, pour de nombreux virus, il a été montré que l'autophagie impacte la réplication virale et/ou la réponse cellulaire à l'infection [5], le rôle de l'autophagie et sa perturbation par le VIA sont encore peu compris.

Les méthodes communément utilisées en laboratoire pour étudier l'autophagie sont peu spécifiques. Elles perturbent en effet d'autres processus métaboliques et/ou les réponses inflammatoires cellulaires, ce qui rend particulièrement difficile l'interprétation des résultats. Ainsi, les inhibiteurs de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), utilisés pour induire l'autophagie, perturbent également la transcription et la traduction cellulaires ainsi que le métabolisme mitochondrial [6]. L'utilisation de la transfection de petits ARN interférents (pARNi) pour limiter l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans l'autophagie montre également des limites puisque la transfection entraîne, en elle-même, un stress cellulaire. Les pARNi peuvent aussi activer les voies de signalisation de l'immunité innée de manière variable, selon leur structure/séquence nucléotidique, ce qui peut conduire à des phénotypes artéfactuels [7]. L'utilisation d'invalidation génique (*knock-out* en anglais) dans des lignées cellulaires afin de les rendre incapables

[1] L'hypercytokinémie est une présence excessive de cytokines pro-inflammatoires dans le sang liée à une réponse inflammatoire excessive.

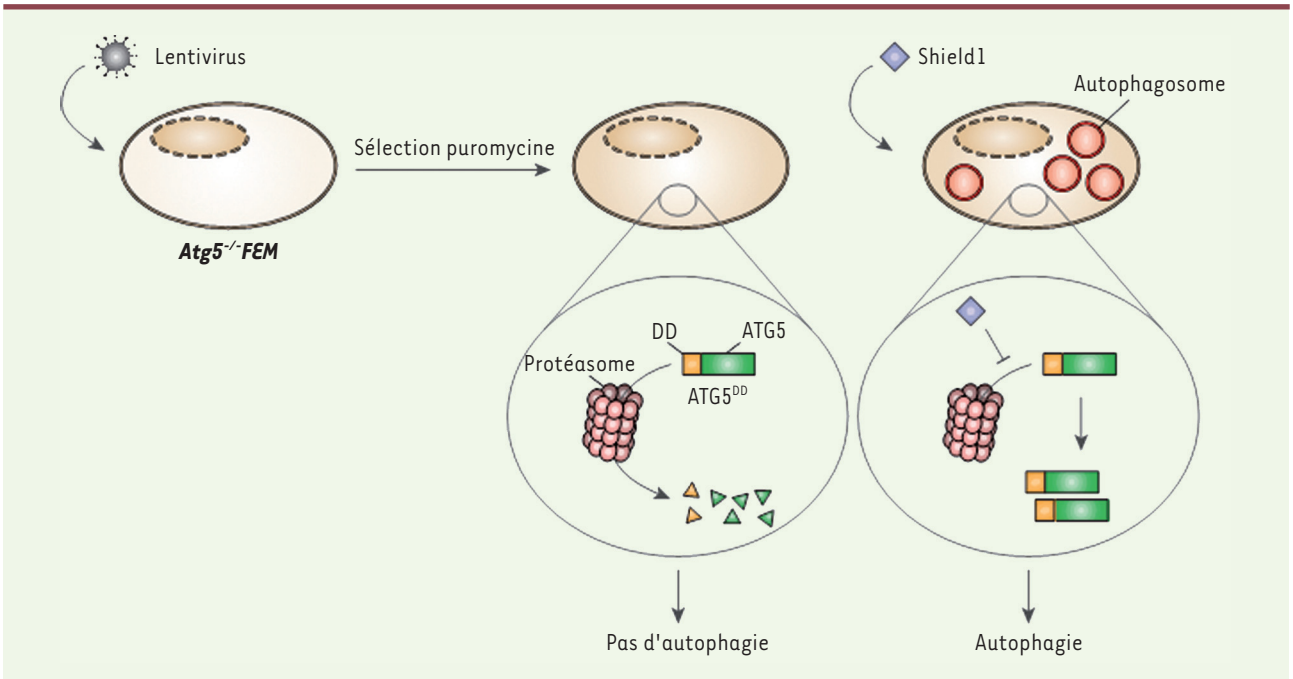

Figure 1. ***Stratégie de génération des modèles cellulaires à capacité autophagique modulable.*** L'exemple des fibroblastes embryonnaires murins (FEM) *Atg5*$^{-/-}$ *(autophagy-related 5)* exprimant de façon stable ATG5^{DD}. L'infection lentivirale des FEM *Atg5*$^{-/-}$ suivie d'une sélection par la puromycine a permis l'expression stable d'ATG5^{DD} (ATG5 fusionnée au motif de déstabilisation DD) dans ces cellules. Cette protéine de fusion est rapidement dégradée par le protéasome : ces cellules sont donc incompétentes pour l'autophagie. Après ajout de la petite molécule chimique Shield1, qui lie le motif DD, la dégradation de la protéine de fusion est empêchée et la capacité cellulaire d'autophagie est restaurée.

d'autophagie montre également des limites : la perte d'un processus clé du métabolisme cellulaire, au cours de plusieurs passages (ou cultures en série) rend risquée la comparaison de telles lignées avec des lignées parentales sans délétion de gène. La dérive génétique entre lignées cellulaires peut en effet être rapide et générer des différences de phénotype qui ne sont pas liées à la perte de l'autophagie induite par la délétion initiale. Pour toutes ces raisons, et pour étudier les interactions entre des phénomènes biologiques complexes (l'autophagie, le stress cellulaire, la réplication virale et les voies de l'immunité innée), nous avons développé des modèles cellulaires dans lesquelles la capacité d'autophagie peut être modulée de manière spécifique et rapide au sein d'une même lignée cellulaire.

Nous avons utilisé des lignées de fibroblastes embryonnaires murins (FEM) déficients pour *Atg (autophagy-related)5* ou *Atg7* (*Atg5*$^{-/-}$ ou *Atg7*$^{-/-}$), des gènes nécessaires à l'autophagie [8] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de I. Vergne *et al.*, *m/s* n° 3, mars 2017, page 312

Nous avons ensuite modifié génétiquement ces lignées pour qu'elles expriment une version des protéines ATG5 ou ATG7, désignées ATG5^{DD} ou ATG7^{DD}, fusionnées à leur extrémité N-terminale avec un domaine de déstabilisation (DD) [9]. La fusion de ce DD à une protéine entraîne sa dégradation par le protéasome. Cette dégradation peut être empêchée par une petite molécule chimique, appelée Shield1, à laquelle la membrane plasmique est perméable[2]. Shield1 n'induit pas de changement transcriptomique par elle-même [9]. Nous avons montré que l'ajout de Shield1 dans le milieu de culture des FEM *Atg5*$^{-/-}$ et exprimant ATG5^{DD}, et dans les FEM *Atg7*$^{-/-}$ exprimant ATG7^{DD}, induisait effectivement la stabilisation des protéines fusionnées au motif DD et permettait aux cellules de retrouver leur capacité autophagique *(Figure 1)* [10]. Ce modèle nous a permis de montrer que l'autophagie n'impacte pas la propension des cellules à s'infecter, ni leur capacité à produire de nouvelles particules virales [10].

Pour étudier l'impact de l'autophagie sur la réaction cellulaire à l'infection, nous avons utilisé une méthode permettant la quantification des molécules d'ARN messagers sans étape de transcription inverse ou d'amplification enzymatique. Nous avons ainsi pu estimer l'expression de 561 gènes impliqués dans l'immunité, le stress et la mort cellulaires. Les cellules incapables d'autophagie présentaient une signature inflammatoire liée à la voie des IFN de type I plus importante que les cellules à capacité d'autophagie intacte [10]. L'expression du gène *Ifnb1*, codant l'IFN-β, le seul IFN de type I exprimé par ces cellules,

[2] Shield1 est une molécule chimique qui stabilise les protéines comportant le motif de déstabilisation (DD) en les protégeant de l'action du protéasome.

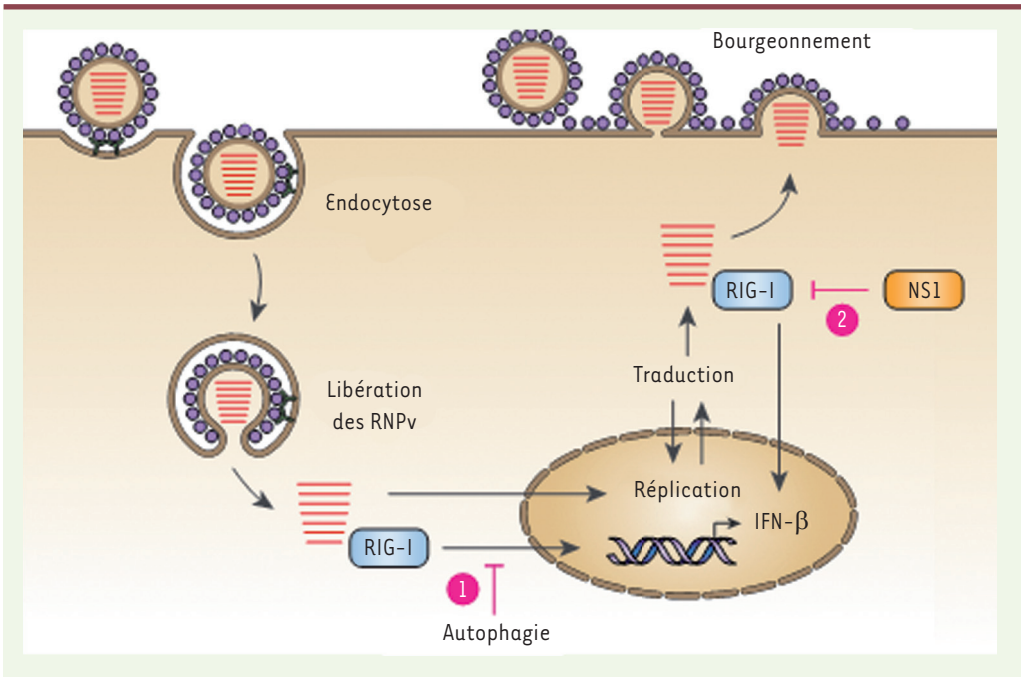

Figure 2. ***Modèle des mécanismes précoce et tardif de limitation de la détection des virus influenza A (VIA) par RIG-I dans la cellule infectée durant le cycle viral.*** Après l'endocytose du VIA, les ribonucléoprotéines virales (RNPv), qui sont libérées dans le cytosol, sont détectées par RIG-I (*retinoic acid-inducible gene I*). Ceci conduit à la transcription de *Ifnb1* (interféron β-1) qui est réprimée par l'autophagie ***(1)*** et induite par le virus. Les RNPv sont ensuite importées dans le noyau où les ARN viraux sont produits, et deviennent invisibles à RIG-I qui est une protéine cytosolique. La traduction de la protéine non structurale 1 (NS1) a alors lieu. NS1 permet l'inhibition de l'activation de RIG-I quand les RNPv sortent du noyau et transitent vers la membrane plasmique pour permettre la génération et le bourgeonnement des nouveaux virions ***(2)*** ; ceci constitue une inhibition tardive de l'induction d'IFN-β par la cellule infectée.

était supprimée par autophagie dans les cellules dès une heure et demi après l'infection, entraînant une induction réduite des gènes stimulés par ces IFN [9]. Parmi ces gènes, on trouve les gènes codant CD274 (aussi connue sous le nom PD-L1 [*programmed death-ligand 1*]), un régulateur négatif majeur de la réponse immunitaire adaptative impliquant les lymphocytes T, le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I), participant à l'élimination des cellules infectées, et CXCL10 (*chemokine [C-X-C motif] ligand 10*), une chimiokine permettant notamment l'attraction des lymphocytes cytotoxiques spécifiques des cellules infectées.

Puisque NS1 (*non-structural protein 1*) est l'inhibiteur viral majeur de la voie des IFN de type I en cas d'infection par le VIA, nous avons cherché à savoir si l'impact négatif de l'autophagie sur l'induction d'IFN-β dépendait de cette protéine virale. L'utilisation d'une souche de VIA incapable de synthétiser NS1 a révélé que cette protéine virale n'était pas nécessaire à la fonction anti-inflammatoire de l'autophagie [10]. Notons ici que NS1 ne semble pas être présente en quantité suffisante dans les virions [11] et nécessite donc une traduction *de novo* dans la cellule infectée pour exercer cette fonction. Nous avons donc décrit un autre mécanisme anti-inflammatoire, plus précoce, et indépendant de NS1, impliquant l'autophagie *(Figure 2)*.

Nos modèles cellulaires ont révélé que l'autophagie, de manière précoce et intrinsèque aux cellules infectées, limite leur propension à sécréter l'IFN-β, ce qui diminue l'expression des gènes stimulés par cette cytokine, notamment celle d'acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative (CD274, CMH I et CXCL10). Il serait désormais intéressant d'étudier dans des cellules épithéliales pulmonaires (cibles du virus) et dans des modèles murins d'infection, l'impact de l'autophagie sur la réplication virale, la réponse inflammatoire et la réponse immunitaire adaptative, ainsi que sur la sévérité des symptômes induits par l'infection.

L'autophagie est donc induite de manière précoce par le VIA. La protéine de matrice 2 du virus interfère ultérieurement avec l'étape de maturation des autophagosomes.

Une meilleure compréhension des dynamiques de perturbation de l'autophagie par le VIA et du rôle des différentes protéines impactant l'activité autophagique pourrait permettre le développement de nouvelles molécules antivirales ou immunomodulatrices pour limiter la pathologie associée à ce virus, mais également la génération de virus atténués induisant une réponse immunitaire plus forte dans le cadre de développement de vaccins. ◊

Macroautophagy limits the early induction of interferon-β during influenza A virus infection

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Chen X, Liu S, Goraya MU, *et al.* Host immune response to influenza A virus infection. *Front Immunol* 2018 ; 9 : 320.
2. Marazzi I, HO JS, Kim J, *et al.* Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic. *Nature* 2012 ; 483 : 428-33.
3. Perot B P, Ingersoll MA, Albert ML. The impact of macroautophagy on CD8 (+) T-cell-mediated antiviral immunity. *Immunol Rev* 2013 ; 255 : 40-56.
4. Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, *et al.* Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* 2009 ; 6 : 367-80.
5. Choi Y, Bowman JW, Jung JU. Autophagy during viral infection - a double-edged sword. *Nat Rev Microbiol* 2018 ; 16 : 341-54.
6. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 2017 ; 168 : 960-76.
7. Robbins M, Judge A, MacLachlan I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* 2009 ; 19 : 89-102.
8. Vergne I, Esclatine A, Biard-Piechaczyk M. Autophagie, protéines ATG et maladies infectieuses. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 312-8.
9. Maynard-Smith L A, Chen L-C, Banaszynski LA, *et al.* A directed approach for engineering conditional protein stability using biologically silent small molecules. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 24866-72.
10. Perot BP, Boussier J, Yatim N, *et al.* Autophagy diminishes the early interferon-β response to influenza A virus resulting in differential expression of interferon-stimulated genes. *Cell Death Dis* 2018 ; 9 : 539.
11. Hutchinson EC, Charles PD, Hester SS, *et al.* Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 4816.

NOUVELLE

Le *purpura fulminans* méningococcique, une énigme partiellement résolue

Hervé Lécuyer[1-2], Xavier Nassif[1-2], Mathieu Coureuil[1]

[1]Institut Necker Enfants Malades, Université Paris Descartes, Inserm U1151, CNRS UMR 8253, 14, rue M.H. Vieira Da Silva, CS61431, 75993 Paris, France.
[2]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades, Service de Microbiologie clinique, Paris, France.
herve.lecuyer@inserm.fr

> *Neisseria meningitidis*, plus communément appelé méningocoque, est une bactérie de la flore normale du naso-pharynx, totalement inféodée à l'être humain (elle ne colonise que l'homme et ne survit pas dans l'environnement extérieur). Cet hôte intime fait très rarement parler de lui. Cependant, dans de très rares cas, le méningocoque traverse l'épithélium du pharynx et se retrouve dans la circulation sanguine. Comme d'autres pathogènes extracellulaires cette bactérie possède une capsule polysacccharidique et exprime plusieurs facteurs de virulence qui la protègent de l'action bactéricide du complément et qui limitent sa phagocytose.

Une caractéristique fondamentale le distingue cependant des autres bactéries : il est capable d'adhérer aux cellules endothéliales, de s'y développer sous forme de microcolonies, et ce y compris en dépit des forces de cisaillement générées par le flux sanguin à la surface des cellules. La bactérie est ainsi capable de littéralement *coloniser* l'endothélium [1, 2]. Ce sont les pili de type IV, fibre protéique bactérienne, qui permettent son adhérence aux cellules endothéliales et sont à l'origine de signaux intracellulaires. Notre équipe a montré que l'adhérence aux cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux et l'activation par les pili du récepteur bêta-2 adrénergique induisait la délocalisation des protéines de jonction serrées et le franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) [3-5] (➜).

(➜) Voir la Nouvelle de M. Coureuil. et X. Nassif, *m/s*, n° 1, janvier 2010, page 15

Ces résultats expliquent ainsi la faculté étonnante du méningocoque à traverser la BHE, avec pour conséquence l'apparition d'une méningite chez environ 60 % des patients infectés.

La complication la plus redoutable de l'infection est le développement d'un syndrome de *purpura fulminans* (PF). Il associe un choc septique très sévère à des nécroses cutanées extensives, touchant notamment les membres, et qui nécessitent souvent d'avoir recours à une chirurgie « délabrante » allant jusqu'à l'amputation. D'autres organes, comme les glandes surrénales, peuvent être également affectées. Les nécroses sont la conséquence de thromboses massives de la microcirculation. Environ 25 % des patients développent un PF et une grande majorité de ceux qui ne développent pas de PF présente un purpura cutané *a minima*, ce qui révèle le caractère pro-thrombotique exceptionnel de l'infection [6].

La physiopathologie du PF et la raison pour laquelle ce syndrome est essentiellement lié aux infections invasives à méningocoque sont longtemps restées un mystère jusqu'à ce qu'un modèle de souris humanisées (des souris SCID [*severe-combined immunodeficiency*] greffées avec de la peau humaine) permette d'étudier *in vivo* l'interaction du méningocoque avec l'endothélium humain. Dans ce modèle, seule l'infection par une souche exprimant des pili de type IV et capable d'adhérer à l'endothélium entraîne le développement de thromboses de la microcirculation [7], révélant un lien direct entre colonisation des cellules endothéliales par la bactérie et développement d'un *purpura fulminans*. Mais quel est le rôle de la cellule endothéliale dans ce processus ? La cascade de coagulation, initiée notamment par la reconnaissance du

https://doi.org/10.1051/medsci/2018288