



HAL
open science

Les radeaux membranaires : des plates-formes de choix pour l'entrée, l'assemblage ou le bourgeonnement de virus

D. Gerlier, Sandrine Alais, Nathalie Chazal

► **To cite this version:**

D. Gerlier, Sandrine Alais, Nathalie Chazal. Les radeaux membranaires : des plates-formes de choix pour l'entrée, l'assemblage ou le bourgeonnement de virus. *Virologie*, 2004, 8 (3), pp.199-214. hal-02147324

HAL Id: hal-02147324

<https://hal.science/hal-02147324>

Submitted on 7 Jun 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.

Virologie

Les radeaux membranaires : des plates-formes de choix pour l'entrée, l'assemblage ou le bourgeonnement de virus

Volume 8, numéro 3, mai-juin 2004

[Imprimer](#)[Ajouter à mes favoris](#)[Citer cet article](#)[Envoyer un lien vers article](#)[Get Permission](#)

Résumé

Texte intégral

Références

Illustrations

Auteur(s) : D. Gerlier¹, S. Alais¹, N. Chazal²¹ Immunité et infections virales, Laboratoire de virologie et pathogenèse virale, CNRS-UCBL UMR5537, IFR Laennec 62, 69372 Lyon Cedex 08² Immunologie-Virologie, EA 3038, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse

Illustrations

[Afficher les illustrations](#)

Des microdomaines spécifiques des membranes cellulaires, appelés radeaux membranaires (*rafts*), sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques, comme le routage biosynthétique des protéines, la transduction du signal ou le routage lors de l'endocytose. Les virus sont des parasites obligatoires de la cellule et sont confrontés aux barrières membranaires au cours de leur cycle de réplication. Ils doivent entrer dans la cellule par fusion, perméation ou décharge endocytique et en sortir par bourgeonnement ou rupture de la membrane plasmique.

Cette revue recense des données expérimentales qui suggèrent, et quelquefois démontrent, l'implication des radeaux membranaires dans certaines étapes du cycle viral : leur rôle comme porte d'entrée, plate-forme d'assemblage et de bourgeonnement de virus. Plutôt que de tendre à l'exhaustivité, nous avons choisi de présenter les modèles viraux qui nous paraissent les plus significatifs, laissant le soin au lecteur de se référer à d'autres revues de la littérature [1-11]. Ce texte est une version abrégée et actualisée d'une revue faisant référence à une bibliographie plus exhaustive et récemment parue [12]. Le lecteur est donc invité à se reporter à cette revue pour trouver les références princeps de la plupart des données décrites dans ce manuscrit. L'élucidation des interactions virus-radeaux nécessite la compréhension du concept des microdomaines membranaires et de leur dynamique.

LES RADEAUX MEMBRANAIRES, ILLUSION OU RÉALITÉ ?

Bien que leur existence ait (et fait encore) débat, le concept de radeaux membranaires est une notion généralement admise [1-13]. Ce sont des microdomaines membranaires nommés radeaux de manière imagée, en référence à leur statut d'amas lipidiques « flottant » au sein de la « mer lipidique mosaïque » selon le modèle développé par Singer et Nicholson. En effet, les protéines et les lipides membranaires ségrègent de manière non aléatoire pour former des amas moléculaires hétérogènes et des îlots plus gros regroupant ces derniers. Les forces cohésives impliquées dans ces regroupements proviennent des interactions lipide-lipide, lipide-protéine, protéine-protéine et des structures intra- ou extracellulaires comme le cytosquelette et la matrice extracellulaire qui délimitent des zones de confinement transitoires d'environ 250 nm de diamètre dans le cas du cytosquelette. Grâce à la capacité des molécules à se réarranger dynamiquement par mouvement brownien, l'architecture membranaire est permissive pour une restructuration continue et dynamique des amas moléculaires et des îlots [3]. Ainsi les temps de résidence d'une molécule est de 0,1 µs à la frontière d'un microdomaine et entre 1 ms et 1 s au sein d'une zone de confinement transitoire [8].

Dans des modèles de membranes artificielles constituées du mélange d'un phospholipide à chaînes d'acide gras insaturées et d'un sphingolipide à chaînes d'acide gras plus longues et saturées, le sphingolipide tend à s'auto-agréger et à se séparer du phospholipide environnant. Mais l'encombrement de sa tête polaire doit être compensé par du cholestérol. L'ensemble s'organise en microdomaines (ou radeaux lipidiques) riches en cholestérol et ayant une structure cristalline dite rigide et ordonnée (phase L_O) distincte de la phase liquide cristal désordonnée (phase L_C) des phospholipides environnants (*figure 1*). La nature « liquide » de ces deux phases est caractérisée par une très grande mobilité interne des lipides constituant, mais la différence d'ordonnement et de mobilité de leurs chaînes d'acide gras constitue une barrière limitant leur mobilité entre phases (effet de ségrégation). La nature plus compacte des liaisons sphingolipides-cholestérol au sein des radeaux les rend (relativement) résistants à la solubilisation par certains détergents non ioniques comme le triton X100 à 1 % (TX100) et à certaines températures (4°C pour le TX100). Cette caractéristique permet de séparer physiquement les radeaux lipidiques des autres constituants lipidiques par solubilisation différentielle et flottation sur gradient de saccharose ou d'iodixanol (*figure 2*). Les radeaux ont été appelés par différents acronymes encore utilisés comme DIG (*detergent insoluble glycolipid enriched complex*) ou DRM (*detergent resistant membrane*).

Cette propriété a permis la séparation et l'analyse de radeaux isolés à partir de membranes biologiques appelées radeaux « membranaires » pour tenir compte de leur composition complexe incluant des protéines. Cette distinction est importante, car les membranes biologiques diffèrent des modèles de membranes artificielles. Leur composition lipidique est bien plus complexe. La présence des protéines tend à déstructurer l'organisation spontanée des lipides en microdomaines, la vitesse de diffusion thermique des lipides est réduite de 10 fois [9]. Enfin, les membranes biologiques sont asymétriques, la composition du feuillet externe étant différente de celle du feuillet interne (*tableau 1*) [4]. Il en résulte que les radeaux membranaires sont hétérogènes ; leur taille est variable et généralement bien inférieure à celle observée dans des membranes artificielles. Il existe un couplage entre les radeaux du feuillet externe et ceux du feuillet interne. Ce couplage est très probablement gouverné par des protéines transmembranaires ayant une propension à s'entourer de lipides constitutifs de radeaux [4].

Tableau 1. Les radeaux (ou microdomaines) membranaires : données biochimiques et morphologiques majeures

Composition		Référence
Diversité des lipides constituant les membranes cellulaires	> 500	[9]
Composition lipidique des radeaux :		
• Feuillet externe	Cholestérol et sphingolipides	[4]
• Feuillet interne	Cholestérol et PS/phospholipides saturés	
Affinité relative du cholestérol pour les autres lipides	Sphingomyéline → PS → PC → PE Acides gras saturés → insaturés ¹	[8]

MON PANIER (0)

MON COMPTE

Bonjour **NATHALIE CHAZAL**[> Connexion à mon institution](#)[> Déconnexion](#)[> Mon compte](#)

MES ABONNEMENTS



Virologie

MES ARTICLES

[> Articles favoris](#)

ALERTES SOMMAIRE

PETITES ANNONCES

NEWSLETTER JOHN LIBBEY

N°10 - Mars 2019



la NEWSLETTER

Éditeur scientifique et médical

Chaque trimestre,
retrouvez les actualités
de votre profession

OPEN ACCESS

2019

YEARBOOK

Santé et Environnement®

Pathologies • Contaminants
Milieu de vie • Fondements scientifiques

Près de 70 articles commentés issus de la littérature internationale
12 synthèses inédites rédigées par les meilleures équipes françaises

Environnement
& Risques
Santé ERS



Caractéristiques des protéines « résidentes » dans les radeaux	<ul style="list-style-type: none"> – Protéines ancrées par un gpi – Protéines solubles ayant 2 (ou 1 + une séquence peptidique chargée positivement) acides myristiques ou 2 acides palmitiques – Protéines transmembranaires ayant des signaux d'adressage particuliers localisés dans l'ectodomaine (O-glycosylation), dans le domaine transmembranaire (palmitoylation fréquente) et dans la queue cytoplasmique (palmitoylation fréquente) 	
Propriétés		
La résistance à la solubilisation d'un détergent varie selon	<ul style="list-style-type: none"> – Température – Concentration relative par rapport à la concentration en lipides et protéines – Nature² 	[50]
Taille des radeaux	<ul style="list-style-type: none"> – Variable de 20 nm² (soit ~ 1 000 lipides et 4 à 5 protéines) à > 1 µm² – Croît avec le degré de pontage par des ligands externes ou internes³ 	[18] [8]
Fraction de la membrane plasmique sous forme de radeaux	Variable de ~ 10 % à ~ 50 %	
Temps de séjour d'une molécule dans un microdomaine membranaire	Variable de > 1 µs à > 10 ms	
Stabilité d'un microdomaine membranaire	Quelques dizaines de secondes ⁴	

¹ Par exemple : l'affinité pour de la sphingomyéline saturée est six fois plus grande que pour du 1-stéaroyl-2-arachidonoyl phosphatidylcholine.

² Par exemple : en conditions équivalentes, un Triton solubilise les lipides avec un ratio de 1 [PE/PS]/2 PC et un détergent zwitterionique avec un ratio inverse de 2 [PE/PS]/1 PC.

³ Voir figure 5.

⁴ Cette durée ne traduit pas la disparition des constituants organisés en microdomaines, mais leur redistribution pour former des nouveaux microdomaines (les radeaux membranaires sont des structures dynamiques en échange permanent avec leur environnement lipidique).

gpi : glycosylphosphatidylinositol ; PC : phosphatidylcholine ; PS : phosphatidylsérine ; PE : phosphatidyléthanolamine.

On ne peut comprendre ni interpréter correctement les données expérimentales relatives aux radeaux lipidiques ou membranaires sans garder à l'esprit les points suivants : la séparation de phase est relative, avec une limite floue, et dynamique, avec échanges entre phases ; l'organisation en phases distinctes est dépendante de la température ; la solubilité vis-à-vis d'un détergent donné est relative et dépendante de la température, des conditions physicochimiques et des propriétés respectives du détergent et du lipide ou de la protéine cible (*tableau 1*) ; outre les interactions lipide-lipide, lipide-protéine, certaines interactions protéine-protéine sont sensibles à l'action du détergent ; la composition lipidique des membranes varie selon l'organelle cellulaire qu'elles délimitent (*figure 3*) ; la proportion relative de certains lipides varie dans le temps et l'espace et, enfin, les radeaux sont des entités très dynamiques. Ainsi, au cours de la transduction du signal, l'accumulation brutale de céramide par action de la sphingomyélinase entraîne une modification de la structure des radeaux, car le céramide tend à déplacer le cholestérol [14]. De même, dans les minutes qui suivent la stimulation d'un récepteur associé aux radeaux, leur composition en protéines varie brutalement et considérablement avec seulement un faible nombre de protéines invariantes [15]. Enfin, la solubilisation par certains détergents pour isoler les radeaux n'est malheureusement pas neutre, car, par exemple, le TX100 peut induire lui-même la redistribution de lipides non miscibles et leur association en microdomaines [5]. Les radeaux définis sur une base purement biochimique ne sont donc pas équivalents aux radeaux définis par une approche d'observation *in situ*.

De nombreux arguments expérimentaux étayent l'existence de radeaux membranaires *in vivo* [12]. Leur taille est estimée entre 25 et 700 nm en utilisant la microscopie à transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET), le suivi de particules individuelles à l'échelle microscopique (SPT) et, plus récemment, par la mesure de polarisation d'une sonde hydrophobe en microscopie biphotonique [16]. En effet, la plus petite unité, qui n'est pas encore un radeau, est constituée d'une protéine entourée d'un manchon fait d'une centaine de molécules lipidiques constitutives des radeaux d'un diamètre de 7 nm environ qui existe en équilibre avec des amas regroupant 4-5 protéines et environ 1 000 lipides occupant une surface d'environ 20 nm² [17, 18]. Ces amas s'agrègent en structures plus grandes sous l'influence, soit d'un agent pontant externe (anticorps ou ligand multivalent) (*figure 4*), soit d'un agent pontant interne (complexe de transduction du signal par exemple). La surface de membrane plasmique occupée par les radeaux varie de quelques pour cent à plus de 50 %, selon le type cellulaire et, dans le cas de cellules polarisées, selon le pôle cellulaire. Les protéines ancrées par un groupement glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), qui sont localisées au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, certaines protéines palmitoylées et les protéines doublement acétylées appendues sous le feuillet interne se localisent dans les radeaux membranaires. Par contre les protéines géranylées en sont exclues [12]. Les radeaux membranaires sont hétérogènes et forment une véritable mosaïque dynamique. Ainsi, les glycosphingolipides GM1 et GM3 s'accumulent respectivement au niveau du lamellipode et de l'uropode des lymphocytes T activés (Harder). L'hémagglutinine du virus influenza, ancrée par son domaine transmembranaire, et une forme recombinante ancrée par un GPI ont une dynamique d'interaction avec leurs radeaux respectifs qui est distincte [19]. Une classe particulière de radeaux est représentée par les *caveolae*. Présentes dans de nombreuses cellules de mammifères, sauf les lymphocytes et les neurones, les *caveolae* sont des invaginations de la membrane plasmique de 50-70 nm de diamètre comportant un manteau strié fait d'oligomères de cavéoline (22 kDa) intimement liées à des molécules de cholestérol [12] (*figure 5*). D'autres classes de radeaux sont sous-tendues par d'autres protéines (reggy/flotilline, MAL, raftline) [6]. Un cas particulier est représenté par les tétraspanines organisées en réseau en association étroite avec du cholestérol [20, 21]. Certains radeaux solubles en 1 % TX100 sont définis par leur insolubilité à une concentration inférieure de TX100 ou dans un autre détergent non ionique comme certains Brij ou le Lubrol [12]. La détermination d'une appartenance à une même sous-population de radeaux peut se faire soit biochimiquement, en triant les radeaux par immunoaffinité, soit fonctionnellement, par l'étude de la capacité de molécules à localiser après réticulation de l'une d'entre elles (*figure 5*). Quelle que soit la méthode choisie, la cohésion des structures fait intervenir du cholestérol et leur dissociation après incubation avec la β-méthyl-cyclodextrine, un chélateur du cholestérol, ou après appauvrissement métabolique en cholestérol, est un critère pour reconnaître l'association d'une molécule avec les radeaux. Cependant, il faut interpréter cette approche avec certaines réserves : il existe des radeaux dépourvus de cholestérol [22] ; l'appauvrissement en cholestérol est plus efficace vis-à-vis des zones hors radeaux. De plus, dans le cas d'une analyse fonctionnelle sur cellule vivante, l'appauvrissement aigu en cholestérol entraîne un accroissement de la perméabilité membranaire, inhibe l'exocytose, bloque la formation des puits de clathrine, délocalise certains intermédiaires lipidiques de signalisation, altère l'organisation de l'actine, inhibe la diffusion latérale des protéines membranaires [5] et change la vitesse et le trafic de l'endocytose [23].

Leur mobilité latérale et rotationnelle permet aux radeaux d'agir comme des plates-formes mobiles transportant certaines protéines depuis le réseau trans-golgien (RTN), vers la surface cellulaire, et de la membrane plasmique vers les endosomes (*figure 3*) [12]. La biosynthèse des glycosphingolipides s'effectue, dans le RTN, à partir d'un précurseur céramide synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et transloqué directement dans le RTN par la protéine CERT [24] (*figure 3*). Le cholestérol est également synthétisé au niveau du RE. Les radeaux s'assemblent donc au niveau du RTN. L'appauvrissement en cholestérol ou le blocage de la synthèse des sphingolipides bloque la formation des vésicules de sécrétion à partir du RTN et les vésicules restent à l'état de bourgeon avec un pédoncule non sessile [12]. Les radeaux de la surface cellulaire agissent comme site d'arrimage pour les protéines impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires importantes comprenant le tri moléculaire vers le pôle apical, la transduction du signal, l'endocytose, l'exocytose [25] et les récepteurs de certains agents pathogènes. Il n'est donc pas surprenant que les radeaux puissent potentialiser le déroulement de certaines étapes du cycle viral comme l'entrée, l'assemblage et le bourgeonnement [12], ou même la réplication d'un virus [26].

LES RADEAUX MEMBRANAIRES COMME PLATES-FORMES D'ENTRÉE

L'entrée d'un virus dans sa cellule hôte implique une interaction spécifique avec un récepteur exprimé à la surface cellulaire. Après son attachement au(x) récepteur(s) cellulaire(s), la pénétration du virus, coûteuse en énergie, intervient rapidement. Un virus peut pénétrer dans la cellule par fusion à la membrane plasmique ou avec la membrane endosomale après internalisation, rupture de la vésicule d'endocytose ou, plus rarement, par translocation de la particule virale directement dans le cytoplasme. Certains virus peuvent entrer selon plus d'une modalité. De nombreuses données suggèrent que les microdomaines membranaires sont une porte d'entrée

L'entrée d'un virus enveloppé implique son attachement et l'apposition des membranes virales et cellulaires [28]. Puis les membranes fusionnent selon un processus qui implique la déstabilisation des feuillettes membranaires et leur fusion en un pore permettant la délivrance de la nucléocapside dans le cytoplasme. La fusion est déclenchée par une modification conformationnelle majeure d'une glycoprotéine d'enveloppe avec exposition d'un peptide hydrophobe (peptide de fusion). Le changement de conformation est gouverné, soit par l'interaction avec le(s) récepteur(s) cellulaire(s), et il a lieu à pH neutre (cas du VIH1, du virus de la rougeole, etc.), soit par l'acidification du milieu environnant au cours de l'endocytose (cas du virus influenza responsable de la grippe) [28].

L'intervention des radeaux membranaires dans l'entrée de virus enveloppés est postulée au vu de quatre arguments développés dans une littérature abondante : leur enveloppe est constituée de radeaux dans lesquels sont enchâssés la ou les protéine(s) d'enveloppe, l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe avec un récepteur lipidique constitutif des radeaux membranaires de la cellule hôte, l'ancrage du ou des récepteur(s) protéique(s) dans des radeaux membranaires et l'inhibition de l'entrée du virus après l'appauvrissement en cholestérol ou son piégeage.

Les enveloppes de nombreux virus, comme le virus grippal influenza, le VIH1, le virus de la rougeole, le virus Ebola, le virus leucémogène murin MuLV, etc., sont riches en radeaux membranaires dans lesquels sont localisées préférentiellement leur(s) protéine(s) d'enveloppe. Cependant, l'importance de cette localisation dans les mécanismes d'entrée n'est pas clairement démontrée [12]. En effet, il est très difficile de tester cette hypothèse sans altérer par ailleurs d'autres paramètres structuraux du virus. Le seul mécanisme admis est la contribution des radeaux comme support conservant les glycoprotéines de fusion dans leur état métastable (c'est-à-dire compétent pour la fusion) comme démontré dans le cas de la gp160 du VIH1 [12] ou comme support favorisant une densité de trimères d'hémagglutinine grippale, qui soit optimale pour la fusion [28]. En effet, la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire fait intervenir une architecture macromoléculaire impliquant plusieurs trimères d'hémagglutinine [28, 29] qui pourraient être représentées par les amas d'hémagglutinine sous forme de radeaux de 200 à 280 nm de diamètre détectables par FRET [29]. La mutation délétère des signaux d'adressage dans les radeaux membranaires entraîne, simultanément, une dispersion plus homogène de l'hémagglutinine et, à niveau d'expression équivalent, réduit de moitié la capacité de fusion [29].

Le VIH1 est le seul exemple pour lequel une interaction directe entre la glycoprotéine d'enveloppe et des glycolipides de la cellule-hôte a été démontrée. Le modèle prédit que la liaison aux glycolipides est secondaire à la liaison au récepteur CD4 (physiquement proche car appartenant aux mêmes microdomaines membranaires) et qu'elle participerait au changement de conformation de la gp41 conduisant à l'exposition des zones d'interaction avec les récepteurs CXCR4 ou CCR5 [12, 30]. Si la localisation du récepteur primaire CD4 au sein des radeaux membranaires est admise, celles des récepteurs CXCR4 et CCR5 fait l'objet d'observations divergentes. L'implication des radeaux membranaires de la cellule cible dans le mécanisme d'entrée du VIH1 est incertaine, car une délocalisation des récepteurs hors radeaux n'empêche pas l'entrée du virus [12, 31, 32]. Un rôle plus subtil est possible, comme celui observé dans le cas de l'entrée du virus du sarcome et de la leucémie aviaire (ASLV). La comparaison de la forme transmembranaire sauvage de son récepteur TVA et une forme de TVA ancrée par un GPI révèle que la structure du récepteur et/ou son association ou non avec les radeaux gouvernent la vitesse d'internalisation et la vitesse d'accès au compartiment endosomal, probablement en modifiant le trafic intracellulaire du virus [33].

En résumé, les SV40 et échovirus 1 sont les seuls exemples indiscutables d'une implication directe d'une sous-population de radeaux membranaires, les *caveolae*, dans le processus d'entrée d'un virus. Dans le cas des virus enveloppés, un ancrage dans les radeaux membranaires contribue certainement à la stabilisation de glycoprotéines de fusion et/ou au regroupement local de leurs oligomères selon une densité/distribution optimisée pour favoriser le processus de fusion des membranes virales et cellulaires. Il est également possible que les radeaux membranaires puissent contribuer au regroupement local de plusieurs récepteurs et/ou assurer le transport du virus vers des récepteurs secondaires. Enfin, aux radeaux membranaires sont appendues de nombreuses structures de transduction du signal (la géométrie en coupe des radeaux est probablement plus proche de celle des icebergs), qui peuvent réguler positivement ou négativement les étapes précoces de la réplication virale postérieures à l'étape de fusion. *A priori*, les lipides constitutifs des radeaux ne sont pas impliqués dans le processus de fusion des feuillettes membranaires qui s'organiseraient en structures non lamellaires [34]. Or les radeaux ont une structure lamellaire qui favorise plutôt un bourgeonnement. Cependant, on ne peut exclure un réarrangement local de la structure lamellaire sous l'influence d'enzyme comme la sphingomyélinase qui, à partir des sphingolipides, génère très rapidement du céramide susceptible de déplacer le cholestérol et d'altérer les propriétés de la bicouche lipidique [14].

LES RADEAUX MEMBRANAIRES COMME PLATES-FORMES D'ASSEMBLAGE

Les étapes tardives du cycle viral sont l'assemblage des éléments structuraux en une particule, sa maturation en virus infectieux et, dans le cas des virus enveloppés, le largage par bourgeonnement à partir de la membrane cellulaire. Bien que nos connaissances se soient notablement accrues ces dix dernières années, les mécanismes de l'assemblage et du bourgeonnement viral sont loin d'être totalement décryptés. Jusqu'à récemment l'assemblage a été étudié comme impliquant seulement les composants d'origine virale, mais de nombreuses données soulignent le rôle des protéines, membranes et radeaux de la cellule hôte.

Les exemples d'assemblage de virus non enveloppés localisé au niveau des radeaux membranaires s'accroissent avec les observations sur les rotavirus [35, 36], le poliovirus [37] et le complexe de réplication du virus de l'hépatite C [38].

L'intervention des radeaux membranaires dans l'assemblage viral est proposée pour plusieurs virus, influenza, VIH1, rougeole, virus respiratoire syncytial, Sendai, leucémie T de l'adulte (HTLV1) [12, 39]. Nous limiterons notre exposé à la réactualisation des données essentielles concernant les trois premiers virus.

L'hémagglutinine du virus influenza et la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), qui agissent comme ligand du récepteur cellulaire et comme protéine de fusion, ont été, initialement, caractérisées comme marqueurs, pour étudier le tri des protéines transmembranaires dans les cellules polarisées. L'association à des membranes résistantes à la solubilisation à froid par des détergents non ioniques a été corrélée avec le ciblage apical d'hémagglutinine et le ciblage basolatéral de la protéine G. De manière concordante, le virus influenza bourgeonne essentiellement au pôle apical et le VSV au pôle basolatéral. Le transport d'hémagglutinine du réseau trans-golgien à la membrane plasmique est ralenti après l'appauvrissement des cellules en cholestérol. Les deux glycoprotéines de l'enveloppe du virus influenza, hémagglutinine et neuraminidase, tendent à se rassembler en amas dans les radeaux membranaires de cellules polarisées ou non. Hémagglutinine et neuraminidase s'associent directement aux composants lipidiques des radeaux. Leur adressage dans les radeaux implique des signaux localisés au niveau du domaine transmembranaire (région du feuillet membranaire externe), de la queue cytoplasmique et de cystéines palmitoylées transmembranaires et/ou juxtamembranaires. La protéine de matrice M1 joue un rôle clé dans l'assemblage des virions. Exprimée isolément, elle s'associe à la face interne de membranes intracellulaires solubles en détergent. En présence des glycoprotéines hémagglutinine et neuraminidase, M1 interagit avec leurs queues cytoplasmiques et, par conséquent, devient associée à des radeaux membranaires. Les deux glycoprotéines participent indépendamment à ce processus, car des virions dépourvus d'hémagglutinine ou de neuraminidase sont correctement assemblés [12]. De plus, la mutation délétère des signaux d'adressage dans les radeaux altère fortement l'incorporation de l'hémagglutinine dans les virions [29]. Cela indique par ailleurs que, s'il existe une interaction hémagglutinine-neuraminidase, elle n'est pas suffisante pour attirer le partenaire hémagglutinine ainsi muté dans les radeaux.

Les radeaux membranaires sont-ils responsables de l'assemblage terminal de tous les composants viraux sous l'enveloppe ? D'après les arguments précédents, on peut proposer un modèle de l'assemblage du virus influenza (*figure 6*). La réplication et la formation des 8 ribonucléoparticules (RNP), contenant respectivement les 8 ARN génomiques, a lieu dans le noyau. Les RNP sont exportées dans le cytosol par les protéines NS2 et M1. Cette dernière les guide ensuite vers les queues cytoplasmiques des glycoprotéines hémagglutinine et neuraminidase préalablement regroupées dans des radeaux de la membrane plasmique. Après biosynthèse dans le RE, ces glycoprotéines migrent (indépendamment ?) vers le réseau transgolgien, où leur affinité commune pour des radeaux membranaires leur permet de s'y regrouper par coalescence des microdomaines qui les hébergent, avant de migrer vers la membrane plasmique (au pôle apical, dans le cas des cellules épithéliales polarisées). Le canal ionique M2 est l'autre constituant clé de

repliement et à la stabilité de l'hémagglutinine au cours de sa biosynthèse pour l'empêcher de s'activer au niveau du compartiment golgien acide. M2 présente plusieurs caractéristiques indicatives d'une possible affinité pour les radeaux : elle est palmitoylée, ciblée vers le pôle apical et requiert la présence de cholestérol pour agir comme canal ionique [12]. Cependant, exprimée isolément, elle n'est pas retrouvée associée aux radeaux résistants à la solubilisation au TX100 à froid [29]. À notre connaissance, il n'a pas été décrit d'interaction de M2 avec un autre constituant viral, ce qui est en accord avec la faible proportion de M2 embarquée dans les virions. Quel mécanisme favorise le cheminement de conserve des protéines hémagglutinine et M2 du RE à l'appareil de Golgi et au-delà ? Comment une fraction limitée de M2 vient-elle s'associer aux radeaux membranaires, support de l'assemblage viral ? M2 est-elle associée à une sous-population de radeaux de structure moins compacte, mais jouxtant les radeaux définis par leur résistance au TX100 à froid ?

Le VIH1 est entouré d'une enveloppe riche en cholestérol et sphingolipides, ce qui suggère un assemblage dans une zone membranaire particulière. Exprimée isolément, la gp160 se localise dans les radeaux et la palmitoylation des deux cystéines de sa queue cytoplasmique sert de signal d'adressage [12]. Cette queue cytoplasmique, transférée sur la protéine CD46, est suffisante pour entraîner cette dernière dans les radeaux [Alais S et Gerlier D, données non publiées]. Les précurseurs des protéines internes Pr55^{gag} (précurseurs des protéines de matrice MA^{gag}, capsid CA^{gag} et nucléocapside NC^{gag}) et Pr160^{gag} (précurseur des protéines gag et des enzymes protéase, transcriptase inverse et intégrase) s'associent aux radeaux membranaires, même en l'absence de la gp160. Le degré de résistance des radeaux hébergeant les précurseurs gag au TX100 a fait l'objet d'observations contradictoires, mais, *in fine*, l'association de Pr55^{gag} avec les radeaux a été confirmée en utilisant un détergent plus doux, le Brij98, et en montrant une colocalisation de la Pr55^{gag} avec le glycosphingolipide GM1 après réticulation de celui-ci [40 et Alais S, Hammache D, Gerlier D et Chazal N, non publié]. Cette association avec les radeaux membranaires intervient dans les 30 minutes après la synthèse de Pr55^{gag} [41]. L'association aux radeaux est induite par le groupement myristoyl sur la glycine N-terminale de la protéine MA et stabilisée par des séquences qui favorisent l'oligomérisation de Pr55^{gag} (P2 et NC). La région MA existe sous deux conformations monomère et trimère, dans lesquelles l'acide myristique est respectivement « caché » et « exposé ». L'état trimérique requiert une concentration élevée de MA. Physiologiquement, la conversion du myristate de « caché » à « exposé » est contrôlée par le degré d'oligomérisation de Pr55^{gag} induite par les régions CA, P2, et NC, oligomérisation renforcée lors de la liaison du domaine NC à l'ARN génomique [42]. La substitution de l'acide myristique par un acide gras insaturé prévient la localisation dans les radeaux. Le Pr55^{gag} synthétisé *in vitro* s'associe à des membranes et devient progressivement résistant à une protéase. Cette maturation est dépendante de la présence de membranes résistantes à la solubilisation par le TX100 contenant des protéines cellulaires intactes. Cela suggère que l'association avec les radeaux, peut-être grâce à une interaction avec une protéine cellulaire résidente, concourt aux changements de conformation, à l'oligomérisation et/ou à l'enveloppement de Pr55^{gag} dans une membrane. Ces changements pourraient favoriser (ou déclencher) la maturation protéolytique de Pr55^{gag} et Pr160^{gag} en activant la protéase virale. Dès le clivage des régions d'oligomérisation P2 et NC de Pr55^{gag}, MA et MA-CA ne sont plus associés aux membranes résistantes au détergent [Alais S, Hammache D, Gerlier D, Chazal N, non publié]. L'incapacité de MA à se maintenir sous forme de trimères après action du détergent à froid induit la réversion de la conformation myristate exposé/caché et donc sa dissociation des radeaux membranaires [42]. L'existence d'une interaction entre la queue cytoplasmique de la gp41 et la sous-unité MA de la Pr55^{gag}, bien que participant à la stabilisation de l'échafaudage viral, est insuffisante pour entraîner, dans les radeaux, une gp41, dont les sites de palmitoylation ont été substitués [12]. La protéine Nef de VIH1 n'est pas une protéine structurale, mais elle est ancrée à la membrane et ciblée dans les radeaux membranaires grâce à une myristoylation et des charges positives à son extrémité N-terminale. Cela permet à Nef d'être incorporée dans l'enveloppe virale, à laquelle elle apporte un surcroît de GM1 et de cholestérol, en stimulant la synthèse et le transport de ce dernier vers les radeaux membranaires du site de bourgeonnement [43]. En effet, le couplage du signal d'adressage aux radeaux issu de Nef à la protéine fluorescente GFP lui permet de s'incorporer efficacement dans les virions. L'ensemble de ces données conforte le modèle des radeaux membranaires comme plates-formes d'assemblage du VIH1 (*figure 7*). Dans ce modèle, ne sont pas représentées les étapes précoces de l'oligomérisation de Pr55^{gag}/Pr160^{gag} qui, de manière progressive, conduit au changement de conformation du domaine MA nécessaire à l'exposition du myristate et qui s'accompagnerait d'un import dans le noyau pour s'associer à l'ARN génomique, puis d'un export dans le cytoplasme [42].

Le virus de la rougeole représente peut-être l'exemple le plus abouti d'un assemblage viral gouverné par les radeaux membranaires [12] (*figure 8*) et illustre l'apport de la technique de séparation physique par flottation de microdomaines membranaires. Dans des cellules infectées, toutes les protéines structurales, y compris la forme mature F₁F₂ de la protéine de fusion et la glycoprotéine H (hémagglutinine) sont enrichies dans les radeaux membranaires, alors que le précurseur F₀ en est exclu. Or, le précurseur F₀ est clivé en sa forme mature F₁F₂ au niveau du réseau transgolgien, lieu de formation des radeaux membranaires. Comme ses analogues fonctionnels, hémagglutinine et gp41gp120 du VIH1, la glycoprotéine F du virus de la rougeole est palmitoylée et adressée spontanément vers les radeaux membranaires. Les glycoprotéines F₀ et H interagissent dès le RE, et la première entraîne la seconde dans les radeaux à partir du réseau transgolgien. En effet, H n'est pas adressée spontanément dans les radeaux. Quand les autres protéines structurales du virus de la rougeole sont exprimées isolément, seule la protéine de matrice M s'associe faiblement aux radeaux membranaires. Contrairement au virus influenza, la coexpression de F, H et M n'accroît pas l'adressage de M dans les radeaux en dépit de l'existence d'une interaction directe entre M et la queue cytoplasmique de F. L'incapacité de la protéine F à entraîner M dans les radeaux est en accord avec l'absence d'un transport commun des protéines M avec les glycoprotéines H et F pour son ciblage sous la membrane plasmique. De manière indépendante des glycoprotéines H et F, l'ARN génomique, la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P et la polymérase L du virus de la rougeole s'associent dans le cytosol pour former une RNP qui attire la protéine M et lui permet de se multimériser en l'entourant [44]. Cette M multimérisée cible probablement les RNP sous les radeaux membranaires riches en glycoprotéines H et F, et l'interaction entre M et la queue cytoplasmique de F stabilise cet échafaudage. En effet, en l'absence de protéine M, aucune particule virale enveloppée n'est produite [45]. Le ciblage de M vers les radeaux, sous la dépendance de sa polymérisation, est similaire à la nécessité d'une oligomérisation pour stabiliser l'association de la protéine de matrice MA du VIH1 dans le contexte du précurseur Pr55^{gag}. Le modèle prédit que les radeaux membranaires, en hébergeant les glycoprotéines H et F et en attirant les RNP recouvertes de protéine M, permettent leur rencontre et leur assemblage. En effet, des particules virales résistantes au TX100 et attachées au cytosquelette ont été observées en microscopie électronique et les radeaux membranaires isolés à partir de cellules infectées sont infectieux [12].

LES RADEAUX MEMBRANAIRES COMME PLATES-FORMES DE BOURGEONNEMENT

Les virus enveloppés acquièrent, au cours de leur bourgeonnement, leur enveloppe dérivée de membranes cellulaires, qui viennent entourer la nucléocapside. Le détachement du virus est habituellement décrit comme un bourgeon épincé. Cette étape requiert une courbure locale de la membrane pour former le bourgeon, puis la formation d'un goulot d'étranglement (dénommé aussi pédoncule lipidique) et enfin sa scission pour libérer le bourgeon. Cette dernière étape implique le mélange des lipides constitutifs des feuillettes internes, puis externes de la membrane d'une manière analogue à la fusion intervenant entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire lors de l'entrée du virus. La capacité des lipides constitutifs des radeaux à gouverner le bourgeonnement des vésicules de transport à partir du RTG suggère que certains virus utilisent les radeaux pour bourgeonner à partir de la surface cellulaire. Cependant, la topologie de ces deux événements est inverse. Le mécanisme permettant aux radeaux membranaires de favoriser le bourgeonnement et/ou la scission du pédoncule lipidique reste énigmatique. La fusion de deux membranes est énergétiquement défavorable et le pédoncule doit contenir une machinerie (d'origine cellulaire) capable d'effectuer la scission. En effet, l'appauvrissement des cellules en ATP bloque le bourgeonnement du VIH1 et il y a accumulation de bourgeons viraux reliés par leur pédoncule à la membrane plasmique [12].

Comme leur intervention dans l'assemblage pouvait le laisser prévoir, les radeaux sont vraisemblablement aussi utilisés pour le bourgeonnement des virus influenza, VIH1, virus de la rougeole et Ebola, mais seuls les trois premiers seront évoqués. Il faut souligner, là encore, les difficultés techniques pour démontrer formellement la nécessité pour un virus d'utiliser les radeaux pour bourgeonner, car toutes les techniques actuellement disponibles sont susceptibles de perturber l'assemblage. Durant le largage des virus enveloppés dans le milieu extracellulaire, les lipides membranaires ne sont pas incorporés dans l'enveloppe virale de manière aléatoire. Les enveloppes virales contiennent donc des lipides dans une proportion différente de celle de la membrane cellulaire à partir de laquelle ils bourgeonnent. L'enveloppe du virus de la peste aviaire, apparenté au virus grippal, est faite essentiellement de complexes résistants à la solubilisation par le TX100 à froid, contrairement à celles du VSV et du SVF qui en sont dépourvus [12]. L'affinité intrinsèque de l'hémagglutinine et de la neuraminidase pour les radeaux lipidiques les entraîne au sein de l'enveloppe, comme le montre la moindre quantité de glycosphingolipides et de cholestérol embarqués en présence de deux glycoprotéines dépourvu de leurs signaux d'adressage. De plus, un virus recombinant exprimant une hémagglutinine, qui n'a plus d'affinité pour les radeaux, a une capacité de bourgeonnement, dénombrée en microscopie électronique, réduite des deux tiers [12]. Ces données suggèrent que le bourgeonnement du virus influenza s'effectue à partir de microdomaines en coalescence. Cependant, l'analyse par microscopie numérique à fluorescence révèle la formation de microdomaines lipidiques au moment du bourgeonnement du VSV. Par ailleurs, son enveloppe a une composition lipidique distincte de celle de la membrane plasmique qui lui a donné naissance. Le VSV pourrait donc également bourgeonner à partir d'une autre sous-population de radeaux membranaires [12].

lymphocyte T avec la lovastatine, un inhibiteur de la synthèse du cholestérol, et sa culture en milieu pauvre en cholestérol inhibent la production de virus. L'analyse du contenu en p24 du matériel membranaire, libéré dans le surnageant par une technique d'immunocapture pour séparer les virus de fragments membranaires d'origine cellulaire, indique que l'enveloppe du VIH1 est riche en glycosphingolipide GM1 et en protéines à ancrage GPI (CD55, CD59), mais pauvre en CD45, une protéine de la surface cellulaire très abondante et non associée aux radeaux. Enfin, la culture des cellules en milieu riche en acides gras insaturés inhibe la libération de particules virales en empêchant l'association de Pr55^{gag} aux radeaux membranaires sans changer sa capacité à se lier aux membranes [12].

Chez le macrophage, le bourgeonnement du VIH1 n'intervient pas à la membrane plasmique, mais par vésiculation intra-endocytique au niveau des corps multivésiculaires selon une typologie similaire à la formation des exosomes. Or les exosomes sont riches en radeaux membranaires [46] et l'enveloppe des virus libérés dans le surnageant de macrophages infectés et analysée après immunocapture a une composition protéique identique : richesse en molécule CD36, une molécule associée aux radeaux et absence de CD14 et de CD45, deux molécules de surface cellulaire associées aux radeaux dans le macrophage, mais absentes des exosomes [25] (*figure 9*). Il est remarquable que la localisation de CD45 soit hors radeaux chez le lymphocyte T et, dans les radeaux, chez le macrophage. Le mécanisme sous-jacent en est inconnu, mais pourrait être dû à la présence ou à l'absence de signaux d'adressage selon les isoformes de CD45 exprimées dans chacun des types cellulaires [6]. Le déterminisme de l'assemblage sous la membrane plasmique ou à la face interne des endosomes selon l'hôte cellulaire T ou macrophage est inconnu. Mais cette étape implique probablement une interaction avec un lipide ou une protéine cellulaire qui n'est pas l'un des partenaires cellulaires connus du peptide P6 du Pr55^{gag}, TSG101 ou AIP1 [47].

Enfin, son recrutement dans l'enveloppe et son rôle dans l'enrichissement en lipides constitutifs des radeaux suggèrent la participation de la protéine Nef dans l'échafaudage conduisant au bourgeonnement, car celle-ci accroît le nombre de particules libérées et leur pouvoir infectieux.

Après l'assemblage du virus de la rougeole dans les radeaux membranaires, les complexes enveloppe-RNP sont prêts pour le bourgeonnement. Ce virus bourgeonne mal. Les particules virales sont de taille et de forme irrégulières et elles contiennent plusieurs RNP chacune. L'enveloppe des virus, largués dans le surnageant, n'est que partiellement faite de radeaux membranaires, auxquels sont retrouvées associées les glycoprotéines H et F mais non les protéines internes. Donc, les virus assemblés au niveau des radeaux pourraient ne pas être les précurseurs des virus bourgeonnants. Alternativement, lors de l'assemblage par coalescence des radeaux, le bourgeonnement induit un relâchement des interactions avec les RNP, sous-jacentes et, simultanément, entraîne la capture de zones membranaires non-radeaux adjacentes (*figure 8*). Deux arguments sont en faveur de la seconde hypothèse : 1) en microscopie électronique, alors que les RNP sont étroitement associées sous la membrane plasmique de cellule infectées, elles ne le sont plus sous l'enveloppe des virions ; 2) un défaut de bourgeonnement à partir d'une cellule murine corrèle avec une faible localisation de la protéine M dans les radeaux [12].

Des protéines cellulaires sont impliquées dans le bourgeonnement viral. Les précurseurs gag des rétrovirus et les protéines de matrice des virus Ebola, VSV et de la rage contiennent des motifs PT/SAP et/ou PPXY qui permettent l'interaction avec les protéines Tsg101, AIP et/ou Nedd4 [12, 48]. Le recrutement de ces protéines cellulaires joue un rôle clé dans l'efficacité du bourgeonnement et du largage de ces virus. Nedd4, qui interagit avec les domaines tardifs du virus de sarcome de Rous et du virus de singe Mazon-Pfizer, est associé aux radeaux membranaires. Le largage d'un VIH1 dépourvu du motif PT/SAP n'est pas réduit, mais accru après appauvrissement en cholestérol [12]. Il reste à déterminer si les radeaux (par coalescence ou non) permettent de rassembler les partenaires viraux et cellulaires ou si, en favorisant l'assemblage viral, ils participent au recrutement local des facteurs cellulaires.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les virus sont construits par la machinerie cellulaire et conçus pour envahir les cellules voisines. Leur fabrication implique un assemblage de multiples composants, acides nucléiques, protéines et lipides dans un site cellulaire adapté. Leurs stratégies d'invasion mettent en jeu des interactions complexes avec la membrane cellulaire. L'interaction entre protéines virales et cellulaires entraîne la formation de complexes dynamiques, capables d'assurer la pénétration virale dans le cytoplasme sans rompre la frontière membranaire avec le milieu extérieur.

La mise en évidence d'une très grande hétérogénéité dans la composition lipidique, des membranes et leur organisation en microdomaines variés comme les radeaux ont apporté de nouveaux outils pour explorer les mécanismes moléculaires responsables de l'entrée, de l'assemblage et du bourgeonnement des virus. Il faut souligner que, dans une étude des radeaux, ce qui importe est l'efficacité de la partition d'une molécule donnée au sein de microdomaines lipidiques en situation d'échanges permanents. Donc, on ne doit pas s'attendre à observer des phénotypes en tout ou rien lorsque l'on cherche à perturber la structure ou la composition des radeaux. Les radeaux agissent principalement comme un milieu lipidique planaire stabilisant les interactions de partenaires moléculaires.

Les questions suivantes doivent être traitées pour mettre en évidence le rôle des radeaux membranaires dans une des étapes du cycle viral. Y a-t-il implication d'une sous-population de radeaux ? Quelle protéine virale (ou récepteur cellulaire) est capable de s'associer aux radeaux par elle-même ? Quels sont les mécanismes ou les motifs d'adressage dans les radeaux ? Quelle protéine virale (ou cellulaire) est entraînée par une autre dans les radeaux et comment ? D'autres questions également importantes doivent être résolues : Quel est le rôle des molécules cellulaires partenaires : rôle de transporteur pour un ciblage vers les radeaux ou cofacteur d'une fonction virale qui peut ainsi être embarqué ? Les radeaux sont-ils une plate-forme intermédiaire (obligatoire) d'oligomérisation promouvant l'échafaudage viral ? La dynamique des radeaux contrôle-t-elle l'oligomérisation et les étapes de maturation qui transforment une capsid immature en un « cœur » mature métastable prêt pour le déshabillage ? Quel avantage le virus retire-t-il à emprunter les radeaux ? Les radeaux permettent-ils d'atteindre localement une concentration critique en molécules partenaires, y compris en certains lipides ? Permettent-ils des changements de conformation des composants structuraux ? Favorisent-ils l'activation (ou l'inactivation) d'une activité virale ou cellulaire ? Favorisent-ils la fusion ou la pénétration de la capsid ? Enfin, gouvernent-ils une signalisation cellulaire favorable à la réplication virale et/ou perturbatrice de l'homéostasie cellulaire ?

La réponse à ces questions requerra de multiples approches associant la purification biochimique des radeaux après solubilisation avec un détergent, des études de biosynthèse et de colocalisation, des reconstitutions dans des membranes artificielles et de l'utilisation de méthodes d'imagerie ou d'analyse non invasives sur cellules vivantes. Quoiqu'il en soit, il faudra garder à l'esprit que toute caractérisation biochimique des radeaux dépend de manière critique de la nature du détergent et des conditions physicochimiques de son utilisation et que ces structures sont intrinsèquement très dynamiques.

La compréhension des mécanismes par lesquels des radeaux membranaires participent au déroulement d'un cycle viral contribuera à mieux connaître certaines étapes de l'infection et certains mécanismes fondamentaux de la biologie. Elle pourrait également faire émerger de nouveaux concepts d'action antivirale et guider la conception de virus recombinants utiles comme outils d'exploration biologique ou comme agents thérapeutiques.

Remerciements. Les auteurs remercient les membres de l'équipe Immunité et Infection virales pour leurs suggestions et la relecture du manuscrit. Les données du laboratoire citées dans cette revue ont bénéficié du soutien du ministère de la Recherche (programme PRFMMIP), de l'ANRS et de Sidaction et ont été obtenues en partie grâce aux instruments du CeCIL, plateau technique de l'IFR Laennec.

