Virus de l'hépatite C et gouttelettes lipidiques

Philippe Roingeard, Christophe Hourioux

▶ **To cite this version:**

Philippe Roingeard, Christophe Hourioux. Virus de l'hépatite C et gouttelettes lipidiques. Médecine/Sciences, 2007, 23, pp.461-464. inserm-00149553

HAL Id: inserm-00149553
https://inserm.hal.science/inserm-00149553

Submitted on 28 May 2007

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.

Médecine/Sciences 2007; 23, 461-464.

Virus de l'hépatite C et gouttelettes lipidiques

Philippe Roingeard, Christophe Hourioux

INSERM ERI 19, Université François Rabelais & CHU de Tours, 10 boulevard Tonnellé 37032 Tours, France.
roingeard@med.univ-tours.fr

Le virus de l'hépatite C (VHC)

Bien que le VHC ait été identifié depuis près de 20 ans et que son génome et ses protéines soient désormais bien connus (Figure 1), le cycle infectieux de ce virus reste encore énigmatique par bien des aspects. Ceci résulte principalement de la difficulté, jusqu'à très récemment, de propager le VHC sur des systèmes de culture cellulaire *in vitro*. Dans ce contexte, différents modèles cellulaires d'étude *in vitro* ont été mis au point. Parmi ces modèles, les rétrovirus pseudo-typés avec les protéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC ont permis d'identifier des éléments clés dans les mécanismes d'entrée du VHC dans la cellule [1]. Les réplicons subgénomiques, constitués par un génome viral contenant une séquence de marqueur de sélection remplaçant la séquence des protéines structurales, ont été un formidable outil pour l'étude de la réplication virale et l'évaluation d'inhibiteurs potentiels de cette réplication [2]. Malheureusement, ces réplicons ne permettaient pas de produire du virus complet et d'étudier la morphogenèse virale. Cette étape du cycle infectieux n'a pu être abordée que grâce à des modèles de surexpression des protéines structurales du VHC, montrant notamment le rôle majeur de la protéine de core dans la morphogenèse de pseudo-virions [3, 4]. Finalement, l'année 2005 aura été un tournant dans la recherche sur le VHC, avec la mise au point d'un système cellulaire permettant de reproduire un cycle infectieux complet du VHC *in vitro* [5]. La communauté internationale des chercheurs sur le VHC doit cette découverte à la persévérance du Dr Takaji Wakita, à Tokyo, qui a eu l'idée de cloner un génome viral à partir du sérum d'un patient atteint d'une hépatite fulminante. Le génome cloné (JFH1) s'est avéré être doté de propriétés particulières (haut niveau de réplication, sans mutations adaptatives en culture cellulaire), permettant la production de particules virales infectieuses. Même si globalement les étapes clés du cycle infectieux (entrée, réplication du génome, morphogenèse) ne sont pas vraiment plus faciles à étudier avec ce système qu'avec

les modèles alternatifs évoqués ci-dessus, ce modèle a le mérite de reproduire ensemble toutes ces étapes, et avec un virus similaire à ceux circulant chez les patients chroniquement infectés.

Les gouttelettes lipidiques

Ces structures ont longtemps été considérées comme des inclusions cytoplasmiques inertes, ne servant qu'au stockage intracellulaire de triglycérides et d'esters de cholestérol (Figure 2A). Cependant, elles ont connu ces dernières années un regain d'intérêt de la part des biologistes cellulaires, pour finalement acquérir un véritable statut d'organite [6]. Participant à la régulation de nombreux mécanismes cellulaires, elles représentent des structures extrêmement mobiles et dynamiques, notamment grâce à des mouvements s'effectuant le long des microtubules du cytosquelette [7]. Il semble qu'en plus de réguler le métabolisme lipidique, les gouttelettes lipidiques soient aussi responsables des échanges de lipides entre les membranes des différents compartiments intracellulaires, contrôlant ainsi la dynamique de la compartimentalisation cellulaire. Elles sont générées dans certaines régions du réticulum endoplasmique (RE), par un mécanisme qui n'est pas encore bien déterminé. Un modèle suggère cependant qu'elles pourraient se former par accumulation de triglycérides entre les deux monocouches de phospholipides de la membrane du RE. Le gonflement de cet espace conduirait alors au bourgeonnement d'une gouttelette entourée d'une monocouche de phospholipides dérivée de la membrane du RE [7]. On ne sait pas cependant si la gouttelette reste associée au RE ou si elle se détache complètement pour s'individualiser.

Interaction entre le virus et les gouttelettes lipidiques

Le lien entre le VHC et ces structures cellulaires a été évoqué pour la première fois il y a une dizaine d'année, lorsque des études d'expression de la protéine de core du VHC en lignées cellulaires *in vitro* ont montré que cette protéine se localisait en surface des gouttelettes lipidiques [8]. Des études complémentaires ont montré que le clivage de la protéine de core par une protéase cellulaire, la SPP (Figure 1A et 1B) est nécessaire pour permettre le trafic de cette protéine vers leur surface [9]. Après ce clivage, la protéine de core du VHC reste ancrée dans la membrane du RE ou associée aux gouttelettes grâce à la présence d'un domaine C-terminal hydrophobe, sans équivalent dans la protéine de core des autres Flavivirus (à l'exception du virus GBV-B, très proche phylogénétiquement du VHC) [10]. L'expression de la protéine de core du VHC en systèmes cellulaires *in vitro* induit une redistribution des gouttelettes lipidiques dans les zones périnucléaires, associée à une co-localisation entre la

protéine et ces gouttelettes (Figure 2B et 2C). La signification de la localisation de la protéine de core du VHC à la surface des gouttelettes lipidiques n'est pas encore bien comprise. Le modèle des pseudo-virions du VHC a cependant montré que le clivage de la protéine de core par la SPP est non seulement essentiel au trafic de cette protéine vers les gouttelettes, mais est aussi requis pour la formation de la particule virale [11]. En outre, ce modèle a permis d'observer que les particules virales s'assemblent et bourgeonnent au niveau de la membrane du RE, à proximité des gouttelettes lipidiques (Figure 2C). De façon intéressante, dans le système de propagation du virus JFH-1, la redistribution périnucléaire des gouttelettes lipidiques et la localisation de la protéine de core du virus à leur surface est également un événement majeur retrouvé dans les cellules infectées [12], même si ce cystème ne permet pas de visualiser la morphogenèse du virus. Ainsi, les sites de formation des gouttelettes lipidiques pourraient constituer des microdomaines favorables à l'assemblage des particules virales, en réunissant des facteurs viraux et/ou cellulaires nécessaires à ces mécanismes de morphogenèse, ou en excluant au contraire des facteurs pouvant l'inhiber.

VHC et stéatose hépatique

Même si l'agression hépatique associée à l'infection chronique par le VHC résulte essentiellement de la réponse immunitaire de l'hôte, certains aspects de la pathogenèse viro-induite sont liés à des effets directs du virus. Parmi ces aspects, la stéatose hépatique, caractérisée par l'accumulation de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes, semble accélérer le développement d'une fibrose du tissu hépatique, qui elle-même contribue à l'installation d'une cirrhose [13]. La protéine de core du VHC peut induire *in vitro* de multiples effets sur la cellule, notamment en interagissant avec de nombreux partenaires cellulaires modulant l'activité transcriptionnelle ou les voies de signalisation cellulaire. Son impact sur l'apoptose, la transformation cellulaire, le métabolisme lipidique ou la modulation de la réponse immune a fait l'objet de nombreuses études [14]. Toutefois, certains de ces résultats sont contradictoires, la plupart de ces travaux ayant été effectués dans des conditions de surexpression de la protéine, et dans des systèmes qui ne reproduisent pas le cycle infectieux du virus. Concernant la modification du métabolisme lipidique, la localisation de la protéine de core du VHC à la surface des gouttelettes lipidiques suggère l'intrigante possibilité que cette localisation pourrait être directement corrélée à la survenue d'une stéatose hépatique frequemment observée chez les patients infectés chroniquement par le VHC. Cette localisation, récemment observée *in vitro* dans des cellules reproduisant un cycle infectieux complet, conforte cette hypothèse. En clinique, la stéatose hépatique est

caractérisée par ses nombreuses étiologies comprenant un excès de poids, un diabète de type II, une hyperlipidémie, une consommation d'alcool ou la prise de certains médicaments. Cependant, même lorsque toutes ces causes possibles peuvent être exclues, un nombre important de patients atteints d'hépatite chronique C présente une stéatose viro-induite [15]. Même si cette stéatose n'est pas spécifique d'un des six génotypes du VHC, les études cliniques montrent que cette stéatose viro-induite est plus fréquente mais également plus sévère chez les patients infectés par un VHC de génotype 3 [15]. Cette observation nous a incité à examiner la variabilité de la protéine de core au sein des génotypes du VHC, tout particulièrement au niveau de son domaine C-terminal hydrophobe exposé après clivage par la SPP. Des investigations conduites sur plusieurs centaines de séquences de différents génotypes ont montré que la phénylalanine (F) en position 164 est un résidu spécifiquement retrouvé chez 75% des VHC de génotypes 3, alors que les autres génotypes possèdent une tyrosine (Y) à cette position. Dans un modèle cellulaire *in vitro* d'expression de la protéine de core du VHC, pour lequel nous avons mis au point une méthode de quantification des gouttelettes lipidiques, il a été montré que l'expression de la protéine de core d'un VHC de génotype 1 induit une augmentation importante de la quantité de gouttelettes lipidiques [16]. De façon tout à fait remarquable, il a été observé que cette même protéine de core dont le résidu en position 164 avait été modifié en phénylalanine (mutant Y164F) était capable d'induire une quantité de gouttelettes lipidiques significativement plus importante que pour la protéine sauvage. Ce modèle cellulaire *in vitro* reproduit donc bien l'observation d'une stéatose viro-induite et génotype-dépendante évoquée par les études cliniques, et renforce l'idée que l'interaction directe de la protéine de core du VHC avec les gouttelettes lipidiques serait impliquée dans le développement de la stéatose hépatique. Les modèles cellulaires d'étude du VHC pourraient ainsi à terme non seulement permettre de mieux comprendre le cycle infectieux viral et la pathogenèse viro-induite, mais également les mécanismes impliqués plus généralement dans la genèse des gouttelettes lipidiques.

Hepatitis C virus and lipid droplets

REMERCIEMENTS

Nous remercions pour leur soutien l'Association Nationale pour la Recherche sur le SIDA et les virus des hépatites (ANRS), la Ligue contre le Cancer (Comités de l'Indre & Loire et du Cher), la Région Centre (contrat ESPRI, Equipe Soutenue en Partenariat entre la Région et l'Inserm)

REFERENCES

1. Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006 ; 348 : 1-12.
2. Bartenschlager R. The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application. *J Hepatol* 2005 ; 43 : 210-6.
3. Blanchard E, Hourioux C, Brand D, *et al.* Hepatitis C virus-like particle budding: role of the core protein and importance of its Asp111. *J Virol* 2003 ; 77 : 10131-8.
4. Roingeard P, Hourioux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell* 2004 ; 96 : 103-8.
5. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005 ; 11 : 791-6.
6. Beckman M. Great balls of fat. *Science* 2006 ; 311 : 1232-4.
7. Martin s, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 ; 7 : 373-8.
8. Barba G, Harper F, Harada T, *et al.* Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 1200-05.
9. McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 2002 ; 21: 3980-8.
10. Hourioux C, Ait-Goughoulte M, Patient R, *et al.* Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endosplasmic reticulum membrane. *Cell Microbiol* 2007 ; 9 : 1014-27.
11. Ait-Goughoulte M, Hourioux C, Patient R, *et al.* Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. *J Gen Virol* 2006 ; 87 : 855-60.
12. Rouillé Y, Helle F, Delgrange D, *et al.* Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* 2006 ; 80 : 2832-41.
13. Fartoux F, Chazouillères O, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mold hepatitis C. *Hepatology* 2005 ; 41 : 82-7.
14. McLauchlan. Properties of the hepatitis C virus core protein : a srtuctural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000 ; 7 : 2-14.
15. Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C : what does it really matter ? *Gut* 2006 ; 55 : 123-30.

16. Hourioux C, Patient R, Morin A, *et al.* The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. *Gut* 2007 ; in press / online first.

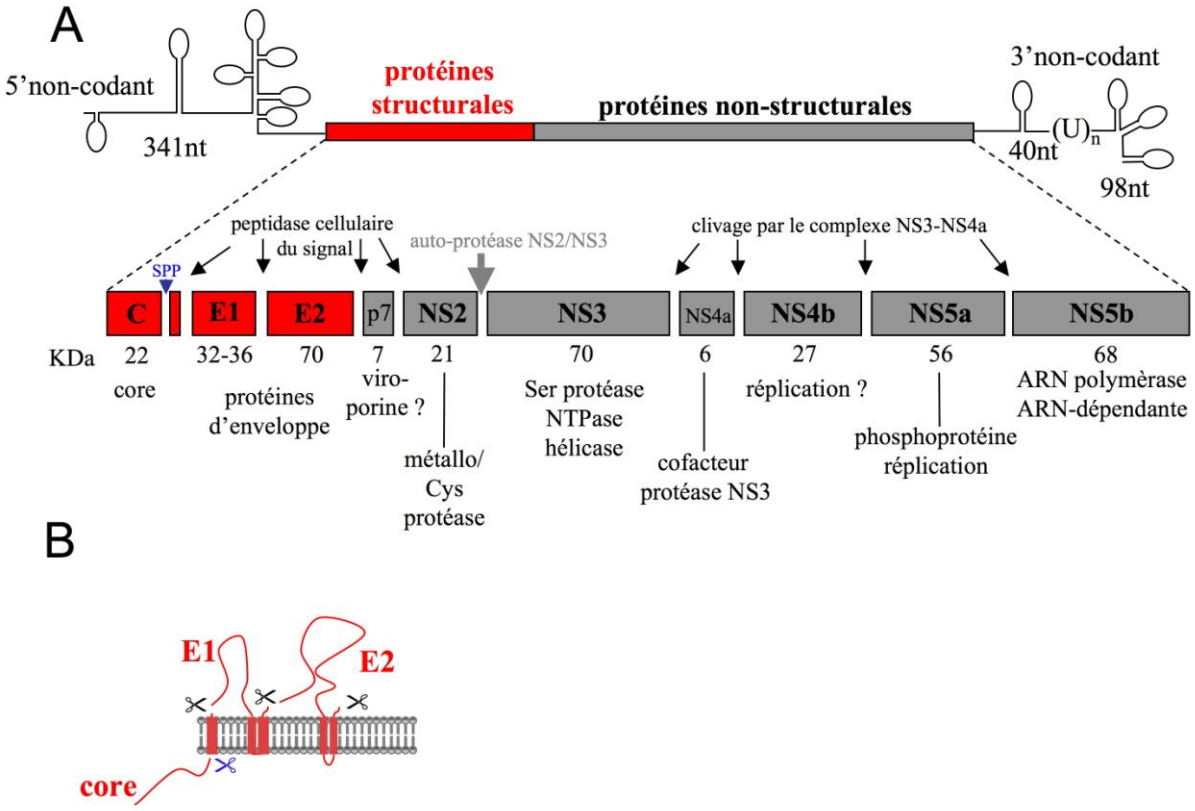

Figure 1. Le génome et les protéines du VHC. **A.** Le génome viral consiste en un ARN simple brin positif de 9.6 kb. Il code pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés. Cette région codante est encadrée en 5' par une séquence non-codante de 341 nucléotides (nt), contenant un site d'entrée du ribosome (IRES), et en 3' par une séquence non-codante essentielle à la réplication virale, de longueur variable. La polyprotéine virale est clivée pour former des protéines structurales (la core et les deux protéines d'enveloppe E1 et E2), servant à l'assemblage du virus, et les protéines non-structurales (de NS2 à NS5b), servant à la maturation de certains domaines de la polyprotéine et à la formation d'un complexe de réplication de l'ARN viral. Ces protéines non-structurales et structurales sont séparées par une petite protéine hydrophobe appelée p7, dont le rôle structural ou non-structural n'est pas encore bien précisé. Les protéines structurales sont générées par un clivage réalisé entièrement par des peptidases cellulaires présentes au niveau du réticulum endoplasmique (RE), alors que les protéines non-structurales sont générées par la protéase virale (NS2/NS3). **B.** Les protéines structurales sont associées à la membrane du RE grâce à une succession de

peptides d'initiation et de terminaison de transfert dans la polyprotéine. Sur la face luminale du RE, la peptidase cellulaire du signal libère les protéines d'enveloppe E1 et E2. La protéine de core subit un clivage additionnel par la peptidase du peptide signal, ou SPP (pour Signal Peptide Peptidase).

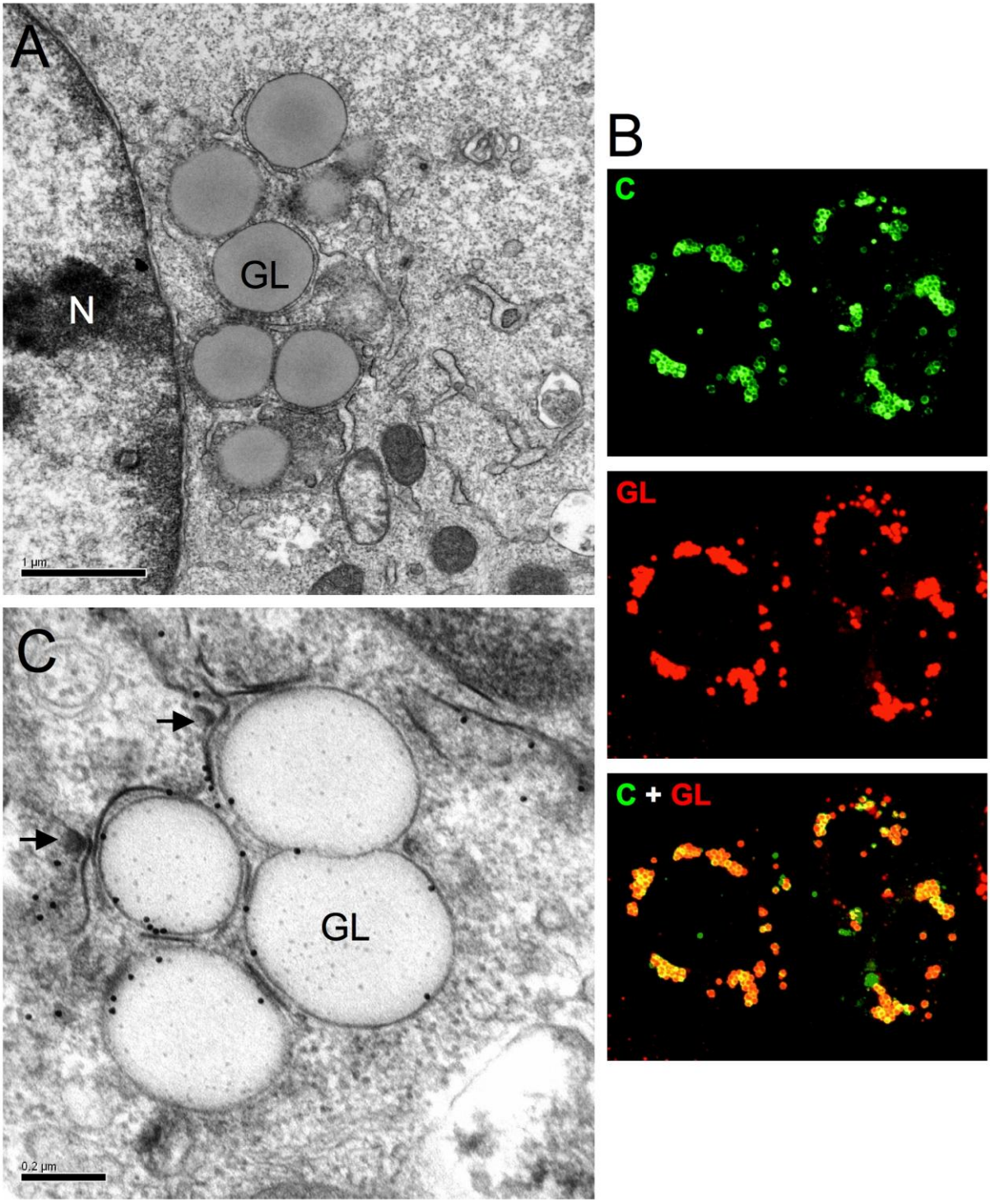

Figure 2. Interaction de la protéine de core du VHC avec les gouttelettes lipidiques. **A.** En microscopie électronique, les gouttelettes lipidiques (GL) apparaissent comme des structures

sphériques homogènes, d'aspect grisé peu dense aux électrons. L'expression de la protéine de core du VHC en système cellulaire *in vitro* induit leur redistribution autour du noyau (N). **B.** La microscopie confocale montre la présence de la protéine de core (C) du VHC en surface des gouttelettes lipidiques (GL). **C.** Des techniques d'immuno-gold utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de core du VHC montrent la présence de cette protéine à la fois à la surface des gouttelettes lipidiques et dans les membranes du RE adjacentes, au sein desquelles se forment par bourgeonnement les particules virales (flèches).