UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

INSERM U1259 Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites

THÈSE présentée par :

Jade Cochard

soutenue le : **27 Octobre 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Combinaison de la différenciation cellulaire et de l'hypoxie physiologique pour l'étude *in vitro* du virus de l'hépatite C : Extension à d'autres *Flaviviridae*

THÈSE dirigée par :

Monsieur CHOUTEAU Philippe	Maître de conférences, HDR, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Madame MARTIN Annette	Directrice de Recherche, Institut Pasteur
Madame ZEISEL Mirjam	Chargée de Recherche, HDR, CRCL Lyon

JURY :

Madame MARTIN Annette	Directrice de Recherche, Institut Pasteur, Université Paris Diderot-Sorbonne cité
Madame ZEISEL Mirjam	Chargée de Recherche, HDR, CRCL Lyon
Monsieur TOUZÉ Antoine	Professeur des universités, Université de Tours
Monsieur ANDRÉ Patrice	Professeur émérite, CIRI Lyon
Monsieur LERAT Hervé	Ingénieur de recherche, HDR, Université Grenoble-Alpes
Monsieur CHOUTEAU Philippe	Maître de conférence, HDR, Université de Tours

« Je ne perds jamais. Soit je gagne, soit j'apprends »
Nelson Mandela

« Quand j'étais petit, ma mère m'a dit que le bonheur était la clé de la vie. Quand je suis allé à l'école, ils m'ont demandé ce que je voulais être quand je serai grand. J'ai répondu heureux. Ils m'ont dit que je n'avais pas compris la question. J'ai répondu qu'ils n'avaient pas compris la vie. »

John Lennon

Remerciements

Je m'excuse par avance si ces remerciements vous semblent trop longs, il me paraissait primordial de remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin à ce travail.

Je tiens à commencer en remerciant chaleureusement **Mirjam Zeisel** et **Annette Martin** d'avoir accepté d'être rapportrices de ce manuscrit de thèse. Je sais combien cette tâche peut être chronophage Je remercie également **Hervé LeRat** et **Patrice André** de participer à ce jury. Enfin, merci à **Antoine Touzé** d'avoir accepté le rôle de président du jury, je termine ainsi mes études supérieures comme je les ai commencées, évaluée par Mr le professeur. J'espère que nous aurons de belles discussions scientifiques lors de ma soutenance. C'est un vrai plaisir et honneur pour moi que vous ayez toutes et tous accepté de participer à l'évaluation de mon travail de thèse.

Je voudrais ensuite naturellement remercier mon directeur de thèse, **Philippe Chouteau**. Évidemment rien de tout ce que j'ai réalisé pendant ces 4 dernières années n'aurait été possible sans toi. Merci d'avoir toujours fait en sorte que je puisse travailler sereinement grâce aux différents financements que tu as légitimement obtenus. Tu as toujours su, dans ton encadrement, trouver le juste équilibre entre l'autonomie et l'accompagnement malgré ton emploi du temps très chargé avec la direction de la LP à l'IUT. Nos conversations, scientifiques ou non, ont toujours été enrichissantes. Tu m'as appris, tout au long de ce doctorat, à ne pas baisser les bras et à prendre du recul sur mon travail. Enfin je te remercie pour ton aide dans la rédaction de mes différents travaux, y compris ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement les différents organismes qui m'ont financée durant ces années de thèse : La **ligue contre le cancer**, la **région Centre Val de Loire** et **l'agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales**.

À notre directeur d'unité, **Philippe Roingeard**, merci pour ta présence, tes conseils mais surtout pour ta bienveillance. Tes conseils et ton avis ont toujours été précieux pour moi. Merci également d'être présent pour nous, les doctorants, dans nos choix de carrière, ton réseau et ta renommée sont d'une grande aide pour nous tous.

Merci **Denys Brand** pour votre disponibilité et votre humour, parfois particulier. Merci de vous préoccuper autant des problèmes divers et variés au laboratoire.

Je remercie également **Angélique** pour sa bonne humeur et sa gentillesse, merci de si bien t'occuper de nos commandes, de nos déplacements etc. J'ai apprécié de passer du temps avec toi, aux pauses cafés ou déjeuner.

Merci infiniment à **Marianne**, une formidable rencontre, merci de croire en moi bien plus que je n'en serai jamais capable moi-même. Merci également d'avoir partagé avec moi un petit peu de tes connaissances sur les arbo je t'en suis très reconnaissante. Merci pour ton soutien et ton écoute, précieuse pour moi. Je suis très fière des projets que nous avons développés. Merci enfin pour ces moments très drôles (le dos de ma combi du L3, mes cahiers de notes etc. s'en souviennent encore..) qui me permettaient de décompresser. Tu vas beaucoup me manquer après mon départ.

Je tiens à remercier **Mathilde** pour sa présence, son soutien sans failles et son aide dans mes travaux. C'est en partie grâce à toi que j'ai poursuivi mes études dans la recherche, depuis mon tout premier stage d'IUT, durant lequel tu m'as si bien encadrée et fait découvrir le monde de la recherche. Ça a été un vrai plaisir de travailler avec toi, je crois qu'on a toujours été sur la même longueur d'onde. Un grand merci pour ton aide dans la relecture de ce manuscrit.

Alain, **papi**, merci infiniment pour le temps que tu m'as consacré notamment au début de ma thèse pour me former à la RT-qPCR. Merci également pour toutes les connaissances que tu as bien voulu partager avec moi (bon en même temps c'est sûr qu'avec toutes les années passées au labo tu as eu le temps d'en accumuler). Merci pour tous les « Alaaaaaaaaaaain j'ai une question », auxquels tu as toujours répondu. Dans un registre moins sérieux merci beaucoup pour toutes les pauses clopes, les moments de folie ou les noms d'oiseaux (que j'avais peut être bien mérités à vrai dire).

Élodie merci beaucoup pour tous tes conseils qu'ils soient scientifiques ou non. J'ai toujours admiré ton sens de l'organisation et ta rigueur scientifique. Merci pour tous les anticorps, virus, plasmides que tu m'as donnés tout au long de ma thèse. J'ai toujours apprécié nos discussions tout au long de ces 4 années.

Merci **Julie** pour ses bons moments passés au L3, parfois très drôles, promis je vais essayer de trouver la relève, que quelqu'un continue lorsque tu es au L3 de te dire « Julie ? », « Oui ? », « Non rien », je sais à quel point tu adores ça ! Trêve de plaisanteries, nous n'avons pas directement travaillé ensemble mais j'ai beaucoup apprécié nos discussions, pas toujours scientifiques.

Je remercie également **Anne Bull** pour son aide et ses conseils précieux. J'ai toujours été admirative de ton travail et de ta rigueur qui m'auront beaucoup inspirée durant ces années de thèse.

Manue, merci d'avoir été pour moi (pour tout le monde en fait) un vrai guide dans le labo, le proverbe dit « rien n'est perdu tant que maman n'a pas cherché » au labo c'est « rien n'est perdu tant que Manue n'a pas cherché ». Merci de nous consacrer du temps à notre arrivée, pour nous expliquer le fonctionnement du labo, et d'assurer autant de choses au labo.

Je remercie également **Mélanie** pour toutes ces discussions pas toujours constructives. Promis j'arrête de laisser des cheveux sur la chaise (enfin je t'en laisserai peut être un peu avant de partir histoire que tu te souviennes de moi).

Merci **Florian** pour .... et bien je ne sais pas comment terminer cette phrase. Merci de faire semblant de nous détester, nous les doctorants (enfin je crois que tu fais semblant). Contrairement à ce que tu diras, je suis sûre que tu vas pleurer quand je vais partir, enfin que tu seras triste, enfin que tu te souviendras de moi, peut-être...

Merci **Amélie** pour nos discussion matinale, merci pour ton soutien et pour tes conseils. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Lorena, merci pour tous tes conseils précieux que ce soit pour les manips ou pour le reste. Merci aussi pour ta bonne humeur, ton sourire et ton sens de l'humour à toute épreuve. Je te souhaite le meilleur pour la suite et espère recroiser ta route un jour

Je remercie **Romu** pour ses conseils et sa bienveillance mais aussi pour son humour, parfois particulier. Merci d'avoir si bien organisé nos différents déménagements de labo.

Merci à **Hugues** pour tous ces conseils précieux, au sujet des manips ou autres. Merci aussi pour ton aide dans la relecture de l'article.

Je remercie **Camille** pour l'excellent stage de M2 qu'il a fait dans notre équipe. Tes travaux sont très précieux pour notre projet. Au-delà de ça je te remercie de ta gentillesse et de ton soutien lors de la période difficile de la fin de ma thèse. Je te souhaite le meilleur pour la tienne, courage, la route est longue mais ça vaut le coup.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire **Nancy**, **Martine**, **Éric**, **Christophe**, **Emmanuelle**, **Catherine**, **Julien**, **Karl** et **Sébastien** avec qui je n'ai pas travaillé directement mais qui ont toujours été de bons conseils et ont toujours eu un œil avisé et bienveillant sur mes travaux lors des différents lab-meetings.

À tous mes co-thésards, sans qui cette thèse aurait été bien triste, j'ai adoré passé ce temps au labo avec vous.
Merci à **Anne**, d'avoir été une stagiaire extraordinaire, tu m'as vraiment facilité la vie durant les 6 mois de ton stage de M2. Merci aussi pour les bons moments passés au labo. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse, tu le mérites grandement.

Thomas, merci pour ta patience, notamment pour les « Thomaaaaas, tu peux me montrer le GRR s'il te plait », approximativement 50 fois par jours .. Je crois ne jamais avoir vu quelqu'un maîtriser la maxiprep aussi bien que toi.

Mon **Flo** merci pour tous ces moments passés avec toi, le labo n'est vraiment plus le même depuis que tu es parti. Je suis sûr que tu déchires dans ton nouveau labo. Merci d'avoir été pour moi un repère quand je suis arrivée dans le labo et que je ne connaissais quasiment personne. Merci (un peu ironique) pour les petits cadeaux que tu me laissais dans l'ascenseur.

Elsa, merci pour tous ces moments passés au L2 ou au L3 dans lesquels nous nous retrouvions très souvent. J'ai apprécié chacun de ces moments. Ta bonne humeur me manqueras. J'espère t'avoir appris un petit peu à maîtriser les expressions de la langue française.

Merci **Charline** pour les matins trop tôt et les soirs trop tard au labo. Merci de m'avoir mis le pied sur une planche de longboard, je pense que le hall de la fac ou le parking se souviennent encore de mes prouesses... Au-delà de tous ces moments j'ai toujours été admirative de la personne que tu es, d'une force incroyable et d'une résilience hors du commun, je te souhaite le meilleur professionnellement et personnellement.

Merci à **Aurélie** pour tous les moments très drôles partagés avec toi, merci d'avoir supporté les changements de fonds d'écrans intempestifs, les petits mots doux laissés dans ton agenda etc..

Merci **Steph** pour tous ces moments passés au labo, pour les pauses muffins myrtilles ou Ice Tea j'ai apprécié chacun de ces moments. Merci aussi de me rappeler mes rendez-vous en permanence, combien en aurais-je raté sans toi ?? Merci pour les post-it qui immortalisent l'ensemble de nos œuvres verbales, je ne suis pas très fière

de certaines. Plus sérieusement merci d'avoir toujours été une oreille attentive pour moi je t'en suis très reconnaissante.

Virgile, Jean-Eud, l'autre c*n, enfin bref choisi le nom que tu préfères. Merci d'avoir accepté d'être mon défouloir de vannes pendant 4 ans, ta résilience vis à vis de ça est impressionnante. Merci de me faire autant rire tous les jours (parfois à tes dépends c'est vrai). Merci aussi pour ton soutien dans la fin de ma thèse, surtout pendant la rédaction, nous y sommes arrivés ça y est. Aller, un dernier pour la route, en gaaaaarde ma mignonne.

Yannick, bientôt 10 ans d'amitié, enfin si on peut dire, 10 ans de noms d'oiseaux et de coups foireux. Mais surtout 10 ans à passer mon temps à t'attendre, t'attendre pour aller manger, t'attendre pour fumer etc. Merci (quand même) d'être un ami formidable et de m'avoir toujours soutenue. Bon courage pour la dernière ligne droite et rendez-vous à Lausanne pour que l'on puisse poser les bases du labo que nous codirigerons, si si tu verras un jour on le fera.

Je remercie également l'ensemble de la plateforme des microscopies **Isabelle**, **Juliette**, **Rustem**, **Pierre-Yvan**, **Guy**, **Sonia**, **Fabienne**, **Marie**, **Florentine** pour leur accueil et leur gentillesse. Je remercie tout particulièrement **Julien** qui m'a formée sur les différents microscopes et qui a même essayé de m'initier aux coupes cryo, merci à toi d'avoir partagé ton savoir précieux avec moi. Merci d'avoir toujours répondu à mes interrogations et promis un jour j'apprendrai à régler les diaphragmes du MET toute seule comme une grande fille.

Un merci particulier aux membres de l'équipe **T2i** qui ont partagé notre labo pendant 2 ans dans la Fac de Médecine, merci pour les coups de main, le dépannage

d'anticorps, de réactifs etc. Ça a été un plaisir de travailler à vos côtés. Un merci particulier à **Christophe Baron** d'avoir accepté de me laisser utiliser votre machine à hypoxie, je vous en suis très redevable. Je remercie également **Stéphanie** et **Marie** pour leur gentillesse et leur aide avec la machine mais aussi pour toutes ces galères de bouteilles d'azote.

Merci à **Hassan** Dakik et **Frédéric** Mazurier pour leur aide dans la construction des lentivirus mais aussi pour le partage de leurs connaissances sur l'hypoxie.

Enfin je remercie l'ensemble des **agents d'entretien** et de la **conciergerie** de la faculté de médecine de Tours, pour toutes les discussions et cafés du matin, vous avez toujours été d'une gentillesse incroyable avec moi. Merci également de faire en sorte que notre environnement de travail soit propre tous les matins.

Je vais à présent remercier mes proches, qui m'ont soutenue même si ils ne comprenaient pas toujours ce que j'ai fait pendant ces 4 années. Je suis désolée de vous avoir un peu délaissé pendant cette thèse, promis je vais me rattraper.

Ghislain, mon chéri, à travers tes yeux je me suis toujours vu plus forte, plus intelligente et plus belle que ce que je ne pourrais jamais me décrire, il paraît que c'est ça l'amour. Tu as été et est toujours mon moteur, une vraie force quand j'en manque parfois. Merci pour ton soutien mais aussi de me supporter quand je suis insupportable, tu as vraiment du mérite. Merci de discuter de virologie avec moi même si tu ne comprends pas toujours tout, merci d'autant me faire rire chaque jours (bon là ok tu as moins de mérite je suis un très bon public). Merci également de me pousser

à me dépasser dans la vie professionnelle mais pas que. Ces 11 années avec toi sont passées à une vitesse folle et j'ai tellement hâte de vivre les suivantes à tes côtés.

Je remercie mes parents de m'avoir offert une merveilleuse enfance heureuse pendant laquelle je n'ai jamais manqué de rien. Je me rends compte à quel point c'est une chance. Je remercie particulièrement ma mère pour son soutien sans failles pendant ma thèse mais plus largement depuis toujours. Merci pour toutes les valeurs que tu m'a transmises mais aussi pour l'exemple que tu nous a donné, à Laura et moi, d'une mère cheffe d'entreprise présente pour ces enfants. J'espère aujourd'hui que tu es fière de moi, soit un peu (beaucoup) fière de toi aussi, je suis ce que tu as fait de moi.

Merci à ma grande sœur **Laura** qui croit toujours en moi et me soutient à chaque moment. Je sais que je peux toujours compter sur toi, quel que soit mon problème, tu répondras présente, j'espère que tu sais que l'inverse est également vrai. Je suis si fière de toi, de la personne que tu es devenue, de ce que tu as accompli dans ta vie. Il me tarde de partager les prochaines étapes avec toi. Merci également à **Mathias** de rendre ma sœur heureuse et d'être la très belle personne que tu es.

Je remercie également mes deux grands-mères, **Mauricette** et **Gisèle**, d'être présentes pour moi, bien que vous ne compreniez pas toujours ce que je fais. Merci pour les souvenirs d'enfance que vous m'avez offerts. Merci pour votre douceur et votre gentillesse. À Mauricette tout particulièrement, une femme incroyable, qui force le respect, merci pour ton amour et ton regard bienveillant. Mère, grand-mère et même arrière-grand-mère, tu n'as rien perdu de ta jeunesse. À mes deux grands-pères,

Albert et **Norbert**, que je n'ai que peu ou pas connus, je regrette profondément de ne pas pouvoir partager ce moment avec vous.

Merci également à mes oncles, tantes, cousins et cousines, **Pascale**, **Gilles**, **Mireille**, **Manu**, **Floriane**, **Morane**, **Marc** et **Mathéo** pour votre présence et vos encouragements.

Je remercie également ma belle-famille, **Véronique**, **Philippe**, **Laura**, **Noé**, **Fabian**, **Dorian**, **Fabienne**, **Xavier**, **Bruno**, **Titoune**, **Josette** de m'avoir acceptée dans votre famille et me faire me sentir à ma place parmi vous. J'ai tellement de beaux souvenirs avec vous tous.

Un grand merci à **Aude**, ma monitrice d'équitation depuis bientôt 10 ans qui m'a tellement appris en tant que cavalière mais également bien au-delà. Grâce à toi j'apprends à remplacer les « je ne suis pas capable » par des « et pourquoi pas ?». Tu es pour moi un exemple de tolérance, de bienveillance, d'écoute, de compassion. Je ne pense pas retrouver une aussi bonne enseignante que toi, la barre est tellement haute, mais je suis convaincue que notre histoire n'est pas terminée.

Aux cavalières/cavaliers des Écuries du Mads : Fabrice, Aude, Cynthia, Cyrielle, Alicia, Inès, Maëlis, Marie, Damien, Zoé, Bianca, Ambre, Héloïse, Hervé, Clémence, Pauline (Chimay), Pauline (Coco), Bertrand, Margot, Mélissa, Caroline, Céline, Bérénice, Pascaline, Élodie, Manon, Élisabeth. Merci pour tous ces moments aux écuries pendant lesquels je pensais (parfois) à autre chose qu'à ma thèse. J'ai plaisir à vous côtoyer, bon quand je suis sur Tiliade pas de trop près... Un merci particulier à

Anthony, Monique et Mélissa pour leur gentillesse et pour le soin qu'ils accordent à nos chevaux.

Enfin, et parce qu'ils font partie intégrante de ma vie, je terminerai par remercier mes animaux, ma jument, Tiliade, qui m'a tellement appris, tellement donné et qui m'a tellement malmenée aussi parfois.... Je chéris chaque moment, hors du temps passé à ses côtés depuis ces 11 dernières années et espère qu'elle m'en offrira encore le plus longtemps possible. Mon petit chat zouzou, tellement particulière dans son caractère, qui m'apprend, comme le fait Tiliade, à aimer les autres pour ce qu'ils sont et pas pour ce que l'on aimerait qu'ils soient. Enfin, à mon chien Mao qui a été le meilleur chien de la Terre pendant les 13 ans qu'il a passé avec nous. Tu nous manques terriblement.

Résumé

La concentration en oxygène dans les différents organes du corps humain est naturellement plus faible que dans l'atmosphère (21% d'O_2 – normoxie), notamment dans le foie où elle est comprise entre 3% et 8% d'O_2 (hypoxie). Par ailleurs, bien que de degrés divers, les virus de la famille des *Flaviviridae* présentent un tropisme hépatique. Or, la très grande majorité des travaux menés *in vitro* pour l'étude de ces virus est classiquement réalisée sous une concentration atmosphérique en oxygène. Il a pourtant été clairement montré que plusieurs voies cellulaires d'importance (croissance cellulaire, survie, métabolisme énergétique et lipidique) sont fortement impactées par la concentration intracellulaire en oxygène, suggérant à la fois que les cycles viraux mais aussi que les conséquences cellulaires d'infection par les *Flaviviridae* pourraient être très lourdement modifiés par l'oxygène moléculaire disponible au sein de la cellule. Cette thèse s'est intéressée à l'étude *in vitro* de certains virus de la famille des *Flaviviridae,* et plus particulièrement au virus de l'hépatite C (VHC) dans un environnement hypoxique. Dans un premier temps, un modèle de culture cellulaire basé sur la combinaison de la différenciation cellulaire et de l'hypoxie prolongée a été développé et caractérisé. Plusieurs acteurs cellulaires d'intérêt pour le cycle du VHC sont favorisés dans ce système cellulaire (accumulation de gouttelettes lipidiques et sécrétion de lipoprotéines riches en ApoE). Dans des cellules Huh7.5 infectées expérimentalement, la combinaison de ces paramètres permet alors la production de particules virales hautement infectieuses, incorporant une grande quantité de lipides, caractéristiques non partagées avec celles produites par les cellules non différenciées et cultivées en normoxie. Ces particules virales du VHC sont également structurellement proches de celles isolées à partir d'un sérum de patient infecté. Ce modèle cellulaire, plus proche de l'environnement hépatique ouvre

de nouvelles perspectives quant aux étapes tardives du cycle du VHC, jusqu'alors peu décrites. De façon tout à fait intéressante, ces conditions de culture représentaient un environnement également favorable pour le cycle du virus de la Dengue (DENV), dont l'hépatotropisme et le cycle viral présente des similitudes importantes avec celui du VHC. Enfin, les travaux menés durant cette thèse ont également permis d'identifier un comportement particulier du virus Zika (ZIKV) lorsqu'il est cultivé sous une concentration physiologique en oxygène. En effet, l'efficacité du cycle viral en cellules cultivées en hypoxie prolongée est significativement diminuée, accompagnant une importante mortalité cellulaire. Ces travaux indiquent une dégradation viro-dépendante, par une voie non conventionnelle, de facteurs de transcription indispensables à l'adaptation cellulaire aux faibles concentrations en oxygène. Si cette voie d'atteinte cellulaire en conditions physiologiques d'oxygénation est confirmée, elle ouvrirait de nouvelles perspectives de compréhension de la physiopathologie associée à l'infection par le ZIKV. En somme, ce travail a permis de mettre en évidence l'importance de respecter une concentration physiologique en oxygène, avec et sans différenciation cellulaire, pour l'étude des virus de la famille des *Flaviviridae*. Plus largement, il pourrait contribuer à une meilleure compréhension des cycles viraux des virus hépatotropes ainsi que des dérèglements cellulaires viro-induits.

Mots clés : Virus de l'hépatite C / *Flaviviridae* / Virus de la Dengue / Virus Zika / Hypoxie / Différenciation cellulaire

Abstract

Oxygen concentration in human body's organs is naturally lower than in atmosphere (21% O_2 – normoxia), particularly in the liver where oxygen is measured between 3% and 8% O_2 (hypoxia). Moreover, despite differences, viruses that belong to the *Flaviviridae* family infect the liver. Nevertheless, *in vitro* studies of these viruses are usually performed under an atmospheric oxygen concentration (normoxia – 21% O_2). It has however been shown that a large proportion of cellular pathways (cell growth and survival, energetic and lipid metabolism) are impacted by low oxygen tensions, suggesting that both viral cycles and cellular pathways during *Flaviviridae*'s infections could be largely modified. This thesis focused on the *in vitro* study of some viruses of the *Flaviviridae* family and more particularly on the hepatitis C virus (HCV) in an hypoxic environment. First, a cell culture model, based on both cellular differentiation and prolonged hypoxia has been developed and characterized. Several cellular features of interest for HCV's life cycle are improved in this model (large lipid droplet accumulation and ApoE-rich lipoproteins). Indeed, this HCV-infected cell culture model allows the production of lipid-rich, highly infectious HCV particles, characteristics that are not shared with those produced by undifferentiated, normoxia-cultured cells. These HCV particles are also structurally close to the ones isolated from an infected patient. The differentiated hypoxia-cultured cells model, which is closer to the natural hepatic environment provides new perspectives on late stages of HCV's life cycle, which are poorly described. Interestingly, these cell culture conditions were also favorable for Dengue virus (DENV), the hepatotropism and cycle of which are similar to those observed for HCV. Finally, during this thesis, a particular behavior of hypoxia-cultured Zika virus (ZIKV) has been identified. ZIKV infection of hypoxia-cultured cells were actually significantly impaired, and paralleled a massive cell death. This work indicates

a viro-induced degradation by a non-conventional pathway of the cellular transcription factors (HIFs) that are essential for the cell adaptation to a low oxygen tension. If these results are confirmed, they would provide a deep comprehension on the pathophysiology associated with ZIKV infection. In sum, this work highlighted the importance of respecting oxygen concentration, with or without cell differentiation, for the study of viruses of the *Flaviviridae* family. More broadly, it could contribute to a better understanding of the viral cycles of hepatotropic viruses as well as viro-induced cell disorders.

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Prévalence virémique mondiale du VHC.

Figure 2. Histoire naturelle de la physiopathologie associée à l'infection par le VHC.

Figure 3. Organisation du génome du VHC

Figure 4 Organisation de la structure linéaire de la protéine core du VHC.

Figure 5. Structure des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC

Figure 6. Répartition géographique des différents génotypes du VHC et nombres d'infections totales.

Figure 7. Classification des antiviraux à action directe (AADs) selon leur cible virale.

Figure 8. Prédiction de l'année d'atteinte de l'objectif d'élimination du VHC, fixé par l'OMS.

Figure 9. Représentation schématique de l'organisation d'une VLDL.

Figure 10. Représentation schématique du transport des VLDL depuis la lumière du RE vers le compartiment cis-golgien.

Figure 11. Structure et biogenèse des GLs.

Figure 12. Organisation de la particule virale du VHC.

Figure 13. Entrée du VHC dans les hépatocytes.

Figure 14. Réarrangements membranaires caractéristiques supportant la réplication de différents virus de la famille des *Flaviviridae.*

Figure 15. Représentation schématique d'un réplicon sub génomique du VHC.

Figure 16. Représentation schématique de l'organisation d'un lobule hépatique.

Figure 17. Gradient d'oxygène dans le lobule hépatique.

Figure 18. Structure linéaire des *hypoxia inducible factors.*

Figure 19. Régulation post-traductionnelle des HIF-α dépendante de l'oxygène.

Figure 20. Exemple de régulation des HIFs α indépendante de l'oxygène : la balance RACK1 / HSP90.

Figure 21. Représentation schématique du protocole expérimental d'obtention des cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$.

Figure 22. Les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ sécrètent significativement plus d'ApoE dans le milieu de culture que les cellules témoins Huh7.5^{Std}.

Figure 23. Localisation intracellulaire de l'ApoE dans les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$.

Figure 24. Les hétérodimères des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 du VHC sont partiellement co-localisés avec la protéine core autour des GLs dans les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$.

Figure 25. La localisation des hétérodimères des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 du VHC autour des GLs dans les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ nécessite l'expression d'une ou d'autres protéines virales.

Figure 26. La combinaison de la différenciation cellulaire et de l'hypoxie prolongée favorise l'infection par le DENV.

Figure 27. L'hypoxie physiologique prolongée limite l'infection des cellules Huh7.5 par le ZIKV.

Figure 28. L'hypoxie physiologique prolongée n'impacte pas la formation des remaniements membranaires induits par le ZIKV en normoxie.

Figure 29. Le ZIKV induit une mortalité cellulaire accrue des cellules cultivées en hypoxie.

Figure 30. Le ZIKV diminue drastiquement l'expression des HIFα en hypoxie.

Figure 31. Contrôle de l'expression des protéines HIF-1α ou HIF-2α dans les lignées transduites *Mut-HIF-1α et Mut-HIF-2α* cultivées en normoxie.

Figure 32. La dégradation viro-induite des HIFs est indépendante des trois sites d'hydroxylation.

Table 1. Densité des particules virales des virus enveloppés à ARN.

Liste des abréviations

AAD :	Antiviraux à action directe
ACAT:	acyl-CoA :cholesterol O-acyltransferase
ADE:	*Antibody dependant enhancement*
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADD complémentaire
ADRP :	*Adipose differentiation-related protein*
AFP :	Alpha-foetoprotéine
ANRT :	*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*
ARFP :	*Alternative reading frame protein*
ARN :	Acide ribonucléique
ATP :	Adenosine Tri Phosphate
bHLH :	*Helix-loop-helix*
CBP :	CREB-binding protein
CD81 :	*Cluster of Differentiation 81*
CHC :	Carcinome Hépatocellulaire
CKIIα	Casein kinase IIα
CR :	Domaine conservé de la glycoprotéine d'enveloppe E1 du VHC
C-TAD :	*C-terminal transactivation domain*
COP :	*Coat protein complexes*
CYP3A4 :	Cytochrome P450
DENV :	Virus de la Dengue
DGAT :	*Diacylglycerol acyltransferase*
DMSO :	Diméthylsulfoxide
DSS:	*Dengue shock syndrome*
ECMV:	Virus de l'encéphalomyocardite
EGF :	E*pithelial growth factor*
ELISA :	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
FAS :	*Fatty acid synthase*
FIH :	*Factor inhibiting HIF*
FIT :	*Fat storage-inducing transmembrane*
GAG :	Glycosaminoglycanes
GFP :	*Green fluorescent protein*
GL :	Gouttelette lipidique
GLUT :	*Glucose transporter*
HEK 293T :	*Human embryonic kidney 293T*
HK :	hexokinase
HLC :	*Hepatocyte-Like cell*
HIG2 :	Hypoxia inducible gene 2
HIF :	*Hypoxia inducible factor*
hNS3:	Activité helicase de la protéine non structurale 3 du VHC
HSP90 :	*Heat shock protein 90*
HSPG*:*	Héparanes sulfate protéoglycanes
HRV :	*Hypervariable region*
HSD17B12 :	*17-betahydroxysteroide dehydrogenase*
HRE :	*Hypoxia responsive element*
hVAP-A :	*Human vesicle-associated membrane protein-associated protein A*

IDL :	*Intermediate density lipoprotein*
IFN :	Interféron
igVR:	Région variable inter-génotypique de la glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC
IL-8 :	Interleukine 8
IRES :	*Internal ribosome entry site*
iPSC :	*Induced-pluripotent stem cell*
JEV :	*Japanese encephalitis virus*
JFH1 :	*Japanese fulminent Hepatitis* 1
kDa :	kilo Dalton
Km:	Constante de Michaelis
LDHA :	Lactate dehydrogenase
LDL :	*Low density lipoprotein*
LDL-R :	Récepteur des LDL
LVP :	Lipoviroparticule
LZIP :	*Leucine zipper domain*
MAPKinase *:*	*Mitogen-activated protein kinase*
MAVS *:*	*mitochondrial antiviral signaling protein*
MET :	Microscope électronique à transmission
MLV :	*Murine leukemia virus*
MOI :	*Multiplicity of infection*
MTP :	Mic*rosomal triglyceride transfer protein*
mTOr:	*Mammelian target of rapamycine*
MRV :	*Mammelian orthoreovirus*
Néo*:*	Néomycine
NTCP :	*Na+-taurocholate cotransporting polypeptide*
NF-κB :	*Nuclear factor-kappaB*
NLS :	*Nuclear localization signal*
NRO :	*Nile Red Oil*
NS :	Non structurale
NTD :	*N-terminal domain*
ODD :	Oxyg*en-dependent degradation domain*
OMS :	Organisation mondiale de la santé
ORF :	*Open reading frame*
PAC :	*PAS-associated COOH-terminal domain*
PAS :	*Per-Arnt-SIM*
PCR :	*Polymerase chain reaction*
pFP :	Peptide de fusion putatif
PGK1 :	*Phosphoglycerate kinase*
PHD :	*Prolylhydroxylase*
PHH :	*Primary human hepatocyte*
Pln :	Perilipine
PI3K/AKT:	Phosphatidyl-inositol 3 Kinase
PI4KIIIa :	Phosphatidylinositol-4 Kinase IIIa
PTG-VTV :	*Post-transgolgi network VLDL transport vesicles*
RACK1 :	*Receptor of activated protein C kinase 1*
RdRp :	ARN polymerase ARN dépendante
RE :	Réticulum endosplasmique
ROS :	*Reactive oxygen species*
RVS :	Réaction virologique soutenue

SARS-CoV1 :	Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 1
sb :	Simple brin
shRNA :	*short hairpin RNA*
SR-B1 :	*Scavenger Receptor class B type1*
SREBP :	Sterol regulatory element binding protein
SVF:	Sérum de veau foetal
TBEV :	*Tick-born encephalitis virus*
TCID50 :	*Tissue culture infectious dose 50%*
TEM*:*	Transition épithélio-mésenchymateuse
TLR :	*Toll-Like receptor*
TMD :	*Transmembrane domain*
TNF :	*Tumor necrosis factor*
TRIF :	*TIR domain-containing adapter-inducing interferon-β*
UTR :	*Untranslated region*
VHB :	Virus de l'hépatite B
VHC :	Virus de l'hépatite C
VHCcc :	VHC adapté à la culture cellulaire
VHCSer :	VHC isolé à partir d'un patient infecté
VHCpp :	Particule virale pseudo-typée du VHC
VHD :	Virus de l'hépatite D
VHL :	*Von Hippel Lindeau*
VIH :	Virus de l'Immunodéficience humaine
VLDL :	*Very Low Density Lipoprotein*
VTV :	*VLDL transport vesicules*
WNV :	*West Nile virus*
YFV :	*Yellow fever virus*
ZIKV :	Virus Zika
ZO-1 :	Zonula Occludens 1

Sommaire

INTRODUCTION

I. Généralités sur le virus de l'hépatite C 1
1.1 Épidémiologie 1
1.2 Histoire naturelle d'une infection par le VHC 2
1.2.1 La transmission virale 2
1.2.2 L'hépatite C aigüe 3
1.2.3 L'hépatite C chronique 3
1.3 La biologie moléculaire du VHC 6
1.3.1 Le génome viral 6
1.3.2 Les protéines structurales 7
1.3.2.1 La protéine core 7
1.3.2.2 La protéine Alternative Reading Frame Protein 10
1.3.2.3 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 11
1.3.3 Les protéines non structurales 14
1.3.3.1 La protéine p7 14
1.3.3.2 La protéine non structurale 2 14
1.3.3.3 La protéine non structurale 3 15
1.3.3.4 La protéine non structurale 4A 16
1.3.3.5 La protéine non structurale 4B 16
1.3.3.6 La protéine non structurale 5A 17
1.3.3.7 La protéine non structurale 5B 18
1.4 Variabilité génétique du VHC 18
1.5 Traitements et limites 20
1.6 Cycle viral et lipides cellulaires 23
1.6.1 Lipides cellulaires impliqués dans les étapes tardives du cycle du VHC 24
1.6.1.1 Biogenèse et sécrétion des VLDL 24
1.6.1.2 Gouttelettes lipidiques 27
1.6.2 Ultrastructure et organisation de la particule virale du VHC 29
1.6.3 Mécanisme d'entrée des particules virales dans les cellules cibles 31
1.6.4 Réplication du génome viral 34
1.6.5 Assemblage 37
1.6.6 Morphogenèse / Sortie des particules virales néo-formées 39
1.7 Modèles cellulaires d'étude du VHC 41
1.7.1 Les hépatocytes humains en culture primaire 41
1.7.2 Les cellules souches pluripotentes induites 42
1.7.3 Les lignées cellulaires dérivées d'hépatocarcinomes 44
1.8 Les modèles viraux 47
1.8.1 Les sera de patients infectés par le VHC 47
1.8.2 Les réplicons sub génomiques du VHC 48
1.8.3 Les particules virales pseudotypées du VHC 49
1.8.4 Les VHC adaptés à la culture cellulaire 50
II. Hypoxie intra-hépatocytaire, VHC et Flavivirus 52
2.1 Structure hépatique et oxygénation naturelle 52
2.2 Les facteurs centraux du métabolisme de l'hypoxie : les *hypoxia inducible factors* (HIFs) 55
2.2.1 Structure et fonctions des HIFs 55
2.2.1.1 Structure des HIFs 55
2.2.1.2 Fonctions des HIFs 57
2.2.2 Régulation des HIFs 58
2.2.2.1 Régulation dépendante de l'oxygène 58

2.2.2.2 Régulation indépendante de l'oxygène 60
2.2.3 HIFs et métabolisme énergétique 62
2.2.4 HIFs et métabolisme lipidique 62
2.3 Hypoxie, VHC et *Flaviviridae* 63
III. Objectifs généraux 66
3.1 Objectifs de l'étude 1 66
3.2 Objectifs de l'étude 2 67
3.3 Objectifs de l'étude 3 67

ÉTUDES EXPÉRIMENTALES 68

I. Étude du VHC dans un modèle *in vitro* combinant différenciation cellulaire et hypoxie naturelle prolongée 69
1.1 Situation du sujet avant la thèse 69
1.2 Objectifs 72
1.3 Approches expérimentales 73
1.3.1 Cultures cellulaires 73
1.3.2 Immunocaptures et observation au microscope éléctronique à transmission 75
1.4 Résultats principaux 75
1.5 Discussion 78
1.6 Article publié 81
1.7 Résultats complémentaires 105
1.7.1 Complément de caractérisation des acteurs du métabolisme lipidique d'intérêt pour le cycle du VHC 105
1.7.2 Localisation intracellulaire des protéines structurales du VHC 109
II. Étude 2 : Infection des cellules Huh7.5Hypo-Diff par le virus de la Dengue 113
2.1 Situation du sujet avant la thèse 113
2.2 Objectifs 114
2.3 Résultats principaux 115
2.4 Discussion 117
III. Étude 3 : Impact de l'hypoxie prolongée sur l'infection par le virus Zika 118
3.1 Situation du sujet avant la thèse 118
3.2 Objectifs 119
3.3 Principales approches expérimentales utilisées 120
3.4 Résultats principaux 121
3.4.1 Impact de l'hypoxie prolongée sur l'infection du ZIKV 121
3.4.2 Conséquences de l'infection par le ZIKV sur les cellules Huh7.5 cultivées en hypoxie 125
3.5 Discussion 129
IV. Travaux publiés, en cours de publication ou en cours de préparation durant la thèse 131

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 133

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 138

INTRODUCTION

I. Généralités sur le virus de l'hépatite C

1.1 Épidémiologie

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé, en 2017 à environ 71 millions le nombre de patients atteints d'une hépatite C chronique, consécutive à une infection par le virus de l'hépatite C (VHC), soit environ 1% de la population mondiale (OMS - Global Hepatitis Report, 2017). La prévalence associée à l'hépatite C est variable en fonction des régions du globe, et peut atteindre, dans les pays les plus touchés, 14,7% en Égypte, 5,5% en Guinée Bissau ou encore 11,3% en Ouzbékistan (Petruzziello et al., 2016) (**Figure 1**). Bien que cette prévalence mondiale tende à diminuer graduellement, en raison notamment du développement de traitements efficaces (voir section 1.5), le nombre de décès associés aux hépatites virales a augmenté de 22% depuis le début des années 2000 (OMS - Global Hepatitis Report, 2017). Ceci souligne le fait que les virus des hépatites en général et le VHC en particulier représentent toujours un problème majeur de santé publique.

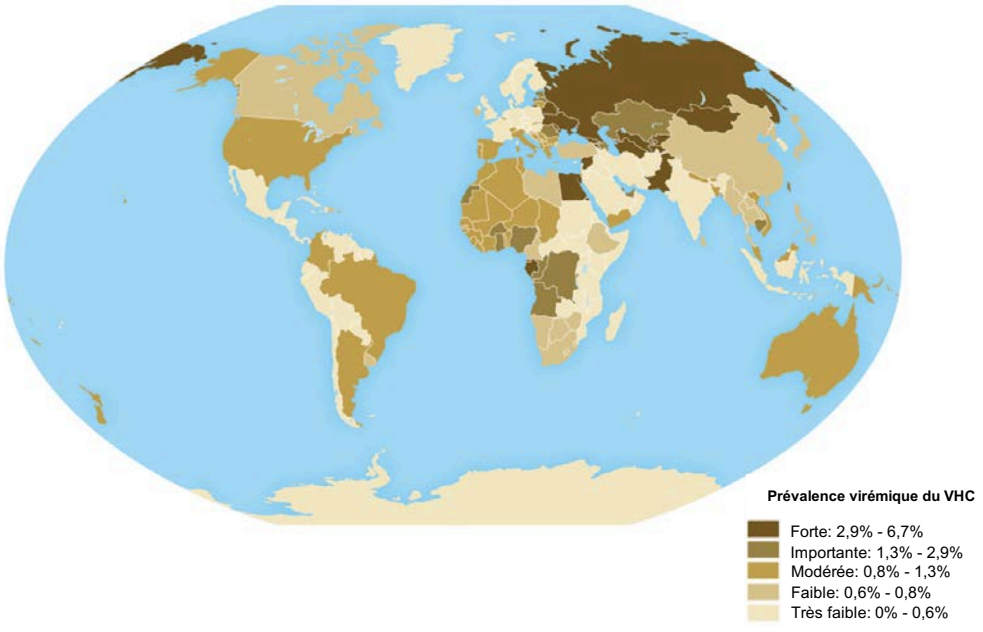


Figure 1. Prévalence virémique mondiale du VHC. *(D'après C.D.C, 2017)*

1.2 Histoire naturelle d'une infection par le VHC

1.1.1 La transmission virale

La transmission du VHC est majoritairement parentérale, et la transfusion de produits sanguins contaminés était une voie de contamination majeure jusqu'à la fin des années 1990. Ce mode de transmission est aujourd'hui quasiment inexistant (risque de 1 pour 1 million en France au début des années 2000) dans les pays qui appliquent un dépistage systématique des produits sanguins (Pour revue, M. Alter, 2011). Certains actes médicaux comme l'hémodialyse (Bravo Zuñiga et al., 2016), ou encore les procédures urologiques invasives (Pekova et al., 2007) (Hauri et al., 2004) (Perz et al., 2010) peuvent être source de contamination lorsque l'hygiène du matériel est inadéquate. De plus, la transmission sexuelle est responsable de 5% des cas d'infection par le VHC (Pondé, 2011 ; Terrault, 2002). Cependant, l'efficacité de la transmission sexuelle de ce virus est inférieure à celle du virus de l'hépatite B (VHB) (environ 8%) et très largement inférieure à celle du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (environ 80%) (Marks et al., 2006; Terrault, 2002; Tufon et al., 2019). La transmission verticale du VHC, de la mère à l'enfant, a également été décrite (Pondé, 2011; Thompson et al., 2003) sans qu'il soit clairement établit si cette contamination survient *in utero* ou *peri* voire *postpartum* (Pondé, 2011; Steininger et al., 2003). Dans les pays développés, les usagers de drogues représentent aujourd'hui la population la plus à risque de contamination par le VHC. Ainsi, en 2011 en France, la prévalence du VHC parmi cette population a été estimé entre 38,9% et 47,7% (Leon et al., 2017). Enfin, environ 10% des cas d'infection par le VHC ne sont pas attribuables à une cause connue. Bien que l'hypothèse des tatouages et piercings réalisés sans sécurité sanitaire ait été avancée, aucune causalité scientifiquement démontrée entre

ces pratiques esthétiques et la transmission du VHC n'a pu être établie à ce jour (M. J. Alter, 2002; Hwang et al., 2006).

1.1.2 L'hépatite C aigüe

Après transmission du VHC, une hépatite aigüe se développe, bien que majoritairement asymptomatique. Les cas symptomatiques sont caractérisés par une jaunisse, des nausées et douleurs abdominales (Westbrook & Dusheiko, 2014). L'hépatite C aigüe peut évoluer vers une guérison spontanée dans 15 à 25% des cas. Cette proportion peut atteindre 45% dans certaines populations : les patients ayant développés une jaunisse, les enfants et les jeunes femmes. Le polymorphisme de deux nucléotides (rs12979860 et rs8099917) du gène Interleukine 28B (*IL28b)* codant l'interféron de type III λ3 (IFN-λ3) a été décrit comme facteur prédictif favorable pour la guérison spontanée de l'hépatite C aigüe (Clausen et al., 2011; Thomas et al., 2009). De plus, une analyse de différents allèles du gène codant le *human leukocyte antigens* (HLA) de classe I a permis de mettre en évidence que les patients porteurs des allèles HLA-A*1101, HLA-B*57 ou encore HLA-Cw*0102 étaient plus à même de guérir spontanément d'une hépatite C aigüe (Thio et al., 2002). Il semble à l'inverse que la co-infection avec le VIH soit un facteur prédictif défavorable pour la résolution de l'hépatite c aigüe (Grebely et al., 2007).

1.1.3 L'hépatite C chronique

Si l'hépatite aigüe n'est pas résolue, une hépatite chronique se met en place. Elle est définie par la persistance de l'ARN viral dans le sang au moins 6 mois après la contamination. Entre 55 et 85% des hépatites aigües évoluent vers une hépatite

chronique (Westbrook & Dusheiko, 2014). Cependant, ces estimations varient en fonction des études, probablement en raison des méthodologies utilisées ou des critères d'inclusion des patients dans ces différentes études. En effet, la proportion exacte d'hépatite C aigüe dans la population générale est difficile à estimer puisque, comme évoqué précédemment, les atteintes hépatiques mineures sont souvent asymptomatiques, donc non diagnostiquées. À l'inverse de l'hépatite aigüe, la guérison spontanée est rare lorsque la phase chronique de l'infection est atteinte. Au cours de cette phase, l'inflammation hépatique persistante et durable peut mener au développement d'une fibrose, caractérisée par le remplacement du tissu hépatique par une matrice fibreuse non fonctionnelle (Dhingra, 2016). Chez 20 à 30% des patients, après plusieurs décennies (entre 20 et 30 ans) d'inflammation hépatique chronique persistante, la fibrose atteint son stade ultime de développement nommée cirrhose. Cette dernière est caractérisée par une fibrose ayant atteint la totalité du foie et par la présence massive de tissus cicatriciel (Conde et al., 2017). Une partie des patients conservent une cirrhose compensée, c'est à dire que les fonctions hépatiques sont conservées, alors que pour d'autres patients la cirrhose se décompense, à l'origine d'ascites, de péritonites bactériennes, d'hémorragies variqueuses ou encore d'encéphalites hépatiques. La survie à 1 an et à 5 ans d'une cirrhose hépatique décompensée chute de 82% et 51%, respectivement (Planas et al., 2004). De plus, le stade cirrhose peut évoluer vers un carcinome hépato-cellulaire (CHC) (1 à 5% par an), qui représente la première cause de mortalité associée à un cancer aux États-Unis (Ogunwobi et al., 2019) et le deuxième et troisième cancer chez l'homme et la femme respectivement, le plus fréquent en France (*Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides*, 2019). L'infection chronique par le VHC reste la première

cause de développement du CHC en Europe de l'Ouest et en Amérique du nord (Petruzziello, 2018). L'histoire naturelle de l'infection à VHC est présentée en **Figure 2.**

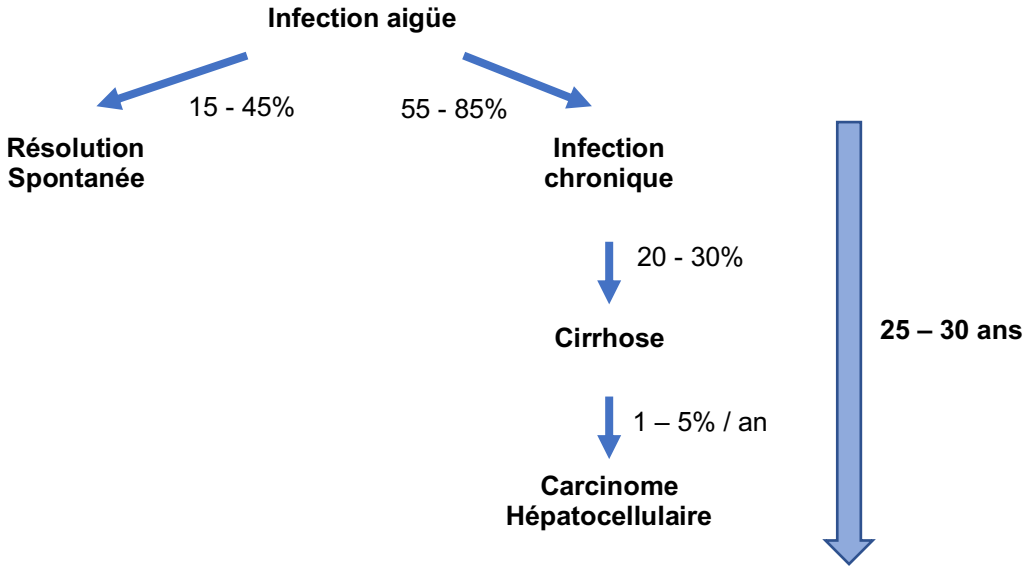


Figure 2. Histoire naturelle de la physiopathologie associée à l'infection par le VHC. *Les pourcentages indiquent la prévalence dans la population infectée par le VHC. Adapté de Lingala et Ghany. 2015*

La survenue du CHC chez les patients porteurs d'une hépatite chronique est multifactorielle et fait intervenir des facteurs viraux, de l'hôte et de l'environnement. Ainsi l'âge (risque de développement augmenté de 2 à 4 fois chez les plus de 55 ans), le genre masculin (risque augmenté de 2 à 3 fois) (Mondelli et al., 2011), la co-infection avec le virus de l'hépatite B et D (VHB et VHD, respectivement ; risque augmenté de 2 à 6 fois vis-à-vis d'une mono infection) (Mondelli et al., 2011) ou avec le VIH, ainsi qu'une consommation d'alcool de plus de 50g par jour sont des facteurs favorisant la progression de la cirrhose hépatique vers le CHC (Aghemo & Colombo, 2013; Petruzziello, 2018). Au-delà des facteurs liés à l'hôte, certaines études tendent à montrer que les patients infectés avec le sous-type 1b du VHC (voir section 1.4) sont plus à risque de progression vers le CHC que ceux infectés par un autre sous-type

(Bruno et al., 1997; Raimondi et al., 2009). Ces conclusions sont toutefois à relativiser puisqu'il s'agit du génotype le plus représenté dans les pays occidentaux et donc le plus étudié (Blach et al., 2017). La progression de la cirrhose hépatique vers le CHC est majoritairement attribuée à l'agression hépatique chronique par le système immunitaire, qui se traduit par un remplacement fréquent des hépatocytes. Cet environnement est alors favorable à la survenue d'altérations génétiques et épigénétiques qui, au cours du temps, peuvent aboutir à un processus de carcinogenèse (Pour revue, El-Serag, 2012). Le génome du VHC n'a pas de capacité d'intégration dans le génome cellulaire et ne code aucune protéine indéniablement reconnue comme oncogène. Néanmoins, les propriétés carcinogènes de certaines protéines du VHC sont aujourd'hui toujours controversées. De fait, le développement de CHC chez des souris transgéniques exprimant la protéine core et/ou les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (voir section 1.3.2.1 et 1.3.2.2, respectivement) sans inflammation hépatique semble étayer l'hypothèse d'un rôle direct du VHC dans ce phénomène (Moriya et al., 1998; Naas et al., 2005). Cependant, le niveau d'expression supra-physiologique des protéines virales dans ces modèles limitent les interprétations. Il apparaît clairement que d'autres études sont nécessaires à une meilleure compréhension du rôle précis du VHC dans le développement du CHC.

1.3 La biologie moléculaire du VHC

1.3.1 Le génome viral

Le génome du VHC est un Acide Ribo Nucléique (ARN) simple brin de polarité positive de 9,6 kilobases (kb). Cet ARN est composé de deux régions non traduites localisées dans la région amino-terminale (Nter) et carboxy-terminale (Cter) de la molécule (5'

UTR et 3' UTR respectivement), qui encadrent un cadre ouvert de lecture ou *Open Reading Frame* (ORF) unique, codant une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés. La polyprotéine virale est produite dans le réticulum endoplasmique (RE). Des clivages co et post-traductionnels assurés par des protéases cellulaires et virales permettent de libérer 10 protéines virales : 3 structurales (Core, E1 et E2) et 7 non structurales (NS) (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) (McLauchlan, 2009) (**Figure 3**). Une protéine virale supplémentaire, nommé protéine F ou *Alternate Reading Frame Protein* (ARFP) a également été décrite (Xu, 2001).

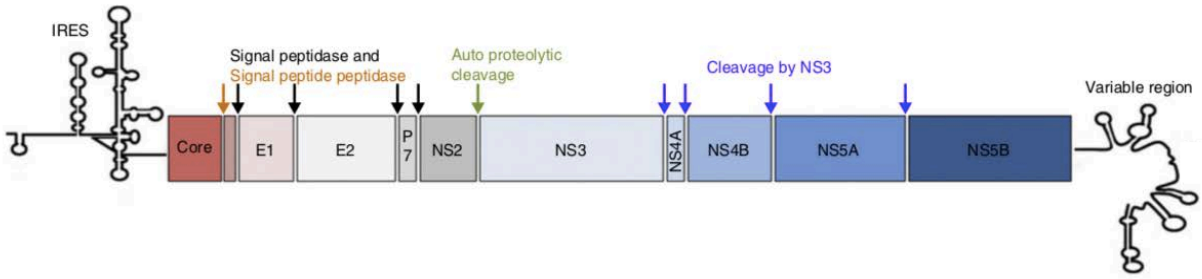


Figure 3. Organisation du génome du VHC. *Les différentes flèches noires, oranges, vertes et violettes représentent les clivages protéolytiques assurés par la signal peptidase, la signal peptide peptidase, la protéase virale NS2/3 et la protéase virale NS3/4A, respectivement. D'après Kao et al., 2016.*

1.3.2 Les protéines structurales

1.3.2.1 La protéine core

La séquence codant la protéine core est celle située la plus en Nter de la polyprotéine virale. Deux clivages assurés par des protéases cellulaires, signal peptidase et signal peptide peptidase permettent de produire la protéine mature de 21 kiloDaltons (kDa) (McLauchlan, 2000). La fonction principale de cette protéine virale est la formation, par homopolymérisation protéique, de la nucléocapside contenant l'ARN viral. Cependant, il semble qu'elle soit également responsable de nombreuses dérégulations cellulaires

qui sont évoquées dans ce paragraphe (Strosberg et al., 2010). Bien que la structure tridimensionnelle de la protéine core du VHC n'a pas encore été résolue, 3 domaines linéaires ont été décrits (**Figure 4**).

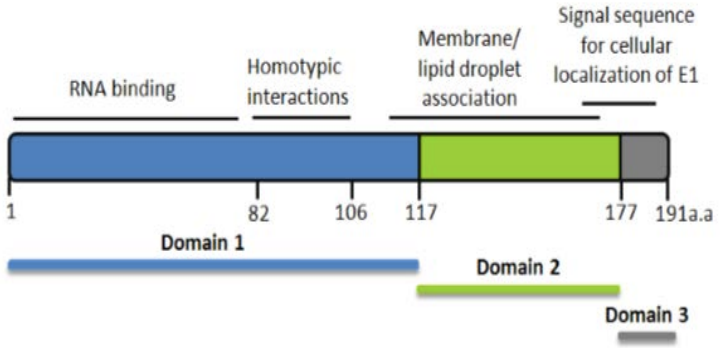


Figure 4. Organisation de la structure linéaire de la protéine core du VHC. *Les domaines 1, 2 et 3 sont représentés en bleu, vert et gris, respectivement. Les positions des différents acides aminés sont notées en bas (a.a = acides aminés). Les fonctions des différents domaines sont indiquées au-dessus du schéma. Adapté de Strosberg et al., 2010*

Le domaine D1 regroupant les 117 premiers acides aminés est hydrophile et riche en acides aminés basiques. La région Nter du domaine D1 (82 premiers acides aminés) riche en résidus chargés positivement (lysine et arginine) est suffisante *in vitro* pour la formation de la nucléocapside lorsque de l'ARN structuré est ajouté à la protéine purifiée (Fromentin et al., 2008; Gawlik et al., 2014; Majeau et al., 2004). Les interactions électrostatiques aspécifiques entre la partie Nter du domaine D1 (chargé positivement) et l'ARN viral (chargé négativement) sont cruciales pour l'encapsidation génomique. Le domaine D2 est plus hydrophobe que le domaine D1 ; il contient deux hélices alpha amphipatiques séparées par une boucle hydrophobe. Cette structure particulière est responsable de l'association de la protéine core avec les membranes du RE et des gouttelettes lipidiques (GLs) cellulaires (voir section 1.6.1.2) (Polyak et al., 2006.). Enfin, le domaine D3 est très hydrophobe et est prédit pour former une hélice alpha correspondant à une séquence signal, en Cter de la protéine core et en

Nter de la glycoprotéine d'enveloppe E1. Ce domaine est rapidement clivé après traduction de la polyprotéine virale et est absent de la protéine core mature. Il est néanmoins essentiel pour l'adressage de la protéine E1 à la membrane du RE. (Polyak et al., 2006.). La multimérisation de la protéine core générant la capside virale ainsi que la symétrie de celle-ci sont des étapes encore mal décrites. Il semble néanmoins que les protéines de capside soient capables de former des homodimères, reliés par un pont disulfure sur un résidus cystéine en position 128 (Kushima et al., 2010). Ces complexes ont été décrits à la fois en contexte réplicatif (par des expériences de transfection du génome entier) et en contexte non réplicatif (par expression de la protéine de capside seule).

Comme évoqué précédemment, la protéine core possède la capacité, *via* son domaine D2, de se lier au GLs de la cellule hôte. Cette localisation particulière a été décrite comme étant essentielle à la production de particules virales infectieuses (Boulant et al., 2007). Il a par ailleurs été montré que la protéine core, à la surface des GLs, recrute plusieurs protéines virales non structurales telles que NS3 ou NS5A (sections 1.3.3.3 et 1.3.3.6) (Galli et al., 2013).

En plus de sa fonction principale de formation de la nucléocapside virale, la protéine core a été identifiée comme modulatrice de plusieurs voies cellulaires. Elle serait ainsi responsable de désordres lipidiques majeurs dans un modèle de souris transgéniques exprimant la protéine core seule où une stéatose hépatique massive (accumulation de GLs) y a été observée (M.-L. Chang, 2007). De plus, la protéine de capside du VHC semble avoir un effet modulateur de l'immunité innée et acquise, en interagissant notamment avec plusieurs composés de la cascade d'activation JAK/STAT. Elle induit ainsi une diminution de la production d'Interféron alpha (IFNα) provoquant de fait une diminution d'expression des gènes activés par l'interféron [ou *Interferon Stimulating*

Genes (ISGs)] (Garaigorta & Chisari, 2009; Heim et al., 1999). La liaison de la protéine core au récepteur du complément gC1qR présent à la surface des cellules immunitaires conduit en outre à une diminution de la production d'Interleukine 12 (Il-12) et donc à un défaut d'activité des lymphocytes T CD8+ et des cellules *Natural Killer* (NK) (Kao et al., 2016; Lukens et al., 2008). Il semble également que certains désordres hépatiques consécutifs à une infection par le VHC soient en partie sous la responsabilité directe de la protéine core. Sa reconnaissance par le *Toll-Like Receptor 2* (TLR-2) est associée à une augmentation de l'expression de facteurs pro-fibrotiques : *Tumor Growth Factor* β (TGF-β), *pro-collagen 1* et *matrix metalloproteinase*, contribuant au développement de la fibrose hépatique (Coenen et al., 2011; Mahmoudvand et al., 2019; Shin et al., 2005; Taniguchi et al., 2004). Enfin, bien que le VHC ne soit pas considéré comme un virus oncogène *per se*, la protéine core semble responsable de dérèglements cellulaires pouvant être à l'origine du CHC (Pour revue, Mahmoudvand et al., 2019). Ainsi Aicher et collaborateurs ont montré en modèle *in vitro* que l'activation de la voie *Wnt/*β*-Catenin* était dépendante des résidus 64 et 71 de la séquence de la protéine core (Aicher et al., 2018).

1.3.2.2 La protéine Alternative Reading Frame Protein

En plus des 10 protéines virales produites à partir de l'ORF conventionnel, un décalage de cadre de lecture ribosomal permet la production d'une protéine virale supplémentaire nommée *Alternative Reading Frame Protein* (ARFP) ou protéine F ou encore core+1. Cette protéine de 17 acides aminés dérive d'une séquence chevauchant celle de la protéine core (Xu, 2001). La présence, dans le sérum de patients infectés, d'anticorps dirigés contre cette protéine virale, atteste qu'elle est bien produite au cours du cycle viral (Xu, 2001). Le rôle précis joué par l'ARFP reste

incertain, de récentes études tendent néanmoins à suggérer l'impact potentiel de l'ARFP dans la pathogenèse viro-induite consécutive à une infection par le VHC. Elle pourrait en effet stimuler la prolifération cellulaire en augmentant le niveau d'expression de la Cycline D1 et en favorisant la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb), engageant plus promptement l'initiation de la phase S du cycle cellulaire (Moustafa et al., 2018).

1.3.2.3 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Contrairement à la majorité des virus de la famille des *Flaviviridae* qui ne codent qu'une protéine d'enveloppe, le VHC en code deux : E1 et E2. Ces deux glycoprotéines transmembranaires de type I sont les acteurs majeurs du mécanisme d'entrée virale dans la cellule hôte et sont les cibles principales de la réponse immune humorale de par leur exposition à la surface des virions.

- La protéine E1 est composée de 191 résidus (35 kDa), organisés en 4 domaines distincts : le domaine N-terminal (NTD), un peptide de fusion putatif (pFP), un domaine conservé (CR) et un domaine C-terminal transmembranaire (TMD) (Drummer, 2014). La protéine E1 contient 4 sites de N-glycosylation (N196, N209, N234 et N305) conservés parmi les différents génotypes viraux (voir section 1.4) et un site (N250) spécifique aux génotypes 1b et 6 (Lavie & Goffard, 2007) (**Figure 5A**). Certaines de ces N-glycosylations ont un impact sur l'infectiosité des particules virales ou encore sur l'immunogénicité de la glycoprotéine E1 soluble (N196 et N305, N209, respectivement) (Tong et al., 2018). De plus, la séquence protéique de la glycoprotéine E1 comporte 8 résidus cystéine hautement conservés parmi les génotypes. Il semble ainsi que la formation de ponts disulfures intra- et intermoléculaires par ces résidus soit possible (Ströh & Krey, 2020). Cependant des résultats contradictoires ont été

obtenus dans différentes études, probablement en raison de la difficulté technique de détermination à la fois de la présence de ces structures, mais aussi de la dynamique de la formation des ponts disulfures au cours de la morphogenèse virale. Il a longtemps été admis que la glycoprotéine d'enveloppe E2 était la protéine impliquée dans le processus d'entrée dans la cellule hôte alors que E1 ne servait que de support à E2 en maintenant sa conformation fonctionnelle requise pour son interaction avec les récepteurs d'entrée (voir section 1.6.3).

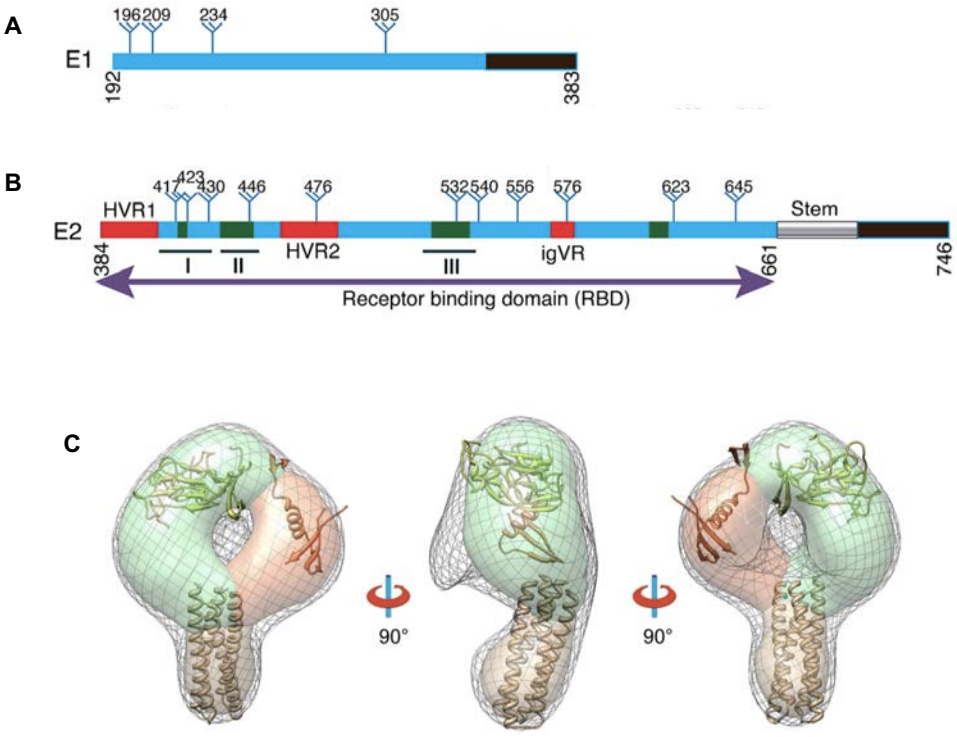


Figure 5. Structure des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC. ***(A)*** *Structure linéaire de la glycoprotéine E1. Les sites de glycosylation ainsi que leur position sur la séquence de E1 sont placés au-dessus du schéma. Le site de glycosylation N250, spécifique des génotypes 1b et 6 n'est pas représenté. Le domaine transmembranaire est représenté en noir. (**B**) Structure linéaire de la glycoprotéine E2. Les sites de glycosylation ainsi que leur position sur la séquence de E2 sont placés au-dessus du schéma. Les trois régions hypervariables (HRV1, HRV2 et igVR) sont indiquées en rouge. Les trois domaines impliqués dans la liaison à la protéine CD81 (I, II et III) sont indiqués en vert. Le domaine transmembranaire est représenté en noir. Le domaine Stem est indiqué en gris. (**C**) Modélisation en trois dimensions de l'hétérodimère E1E2. Sur ce schéma, la protéine E1 est représentée en orange, la protéine E2 en vert et leur domaine transmembranaire en marron. D'après Drummer et al., 2014 ; Cao et al., 2019*

Il semble néanmoins que la présence de E1 dans le complexe hétérodimérique E1E2 soit essentielle à son interaction avec certains récepteurs cellulaires (Tong et al., 2018) (voir section 1.6.3). La présence du domaine pFP ainsi que la capacité de la glycoprotéine E1 à former des trimères laissent à penser que E1 pourrait jouer aussi le rôle de protéine de fusion après endocytose de la particule (Tong et al., 2018).

- La glycoprotéine E2 est composée de 362 résidus (70kDa) organisés en 3 domaines : le domaine N-terminal, le domaine *front layer*, et le domaine *CD81 binding loop* (Ströh & Krey, 2020). La séquence de E2 contient également 3 régions hypervariables (HRVs) : HRV1, HRV2 et la région variable inter-génotypique (igVR) (**Figure 5B**). Tout comme E1, la protéine E2 est hautement glycosylée et contient ainsi 11 sites de N-glycosylation conservés. Le retrait de certains de ces sites par mutagenèse dirigée conduit à une augmentation de la sensibilité des anticorps neutralisants, suggérant leur rôle dans l'échappement au système immunitaire (Ströh & Krey, 2020). En plus des sites de N-glycosylation, la séquence protéique de E2 contient également 18 cystéines conservées, formant un réseau de pont disulfure. Ces modifications post-traductionnelles compliquent fortement les études structurales en haute résolution (Yost et al., 2018). La protéine E2 est l'acteur viral majeur dans l'étape d'entrée du VHC dans la cellule cible. Elle se lie en effet spécifiquement aux récepteurs cellulaires du VHC (voir section 1.6.3) comme le *Scavenger Receptor class B type I* (SR-B1) ou le *Cluster of Differentiation 81* (CD81).

Les glycoprotéines d'enveloppe du VHC s'assemblent en hétérodimères par leur domaine TMD respectifs (Cao et al., 2019; Freedman et al., 2016) (**Figure 5C**). L'expression hétérologue de E1E2 mène à la production d'agrégats mal repliés alors que ces complexes semblent être stabilisés par des ponts disulfures à la surface des

particules virales (Dubuisson & Cosset, 2014). Cette différence de structure du complexe E1E2 est encore mal comprise et reste un sujet d'étude pour un certain nombre équipes.

1.3.3 Les protéines non structurales

1.3.3.1 La protéine p7

La protéine p7, aussi appelée NS1, est une petite protéine (63 acides aminés) présentant une topologie en épingle à cheveux et composée de deux segments transmembranaires (Denolly et al., 2017). Les propriétés ainsi que la structure et la topologie de p7 ont conduit à la classer parmi la famille des viroporines, au même titre que la protéine M2 du virus *influenzae* ou que la protéine Vpu du VIH (Steinmann et al., 2007). Les viroporines forment des pores hydrophobes qui modulent la perméabilité membranaire, favorisant ainsi la propagation virale. La protéine p7 du VHC est capable de former un canal ionique hexamérique ou heptamérique, sélectif des cations (Ying et al., 2019). En plus de cette fonction de canal ionique, la protéine p7 semble également être essentielle pour les étapes d'assemblage et de sortie des particules virales du VHC à l'extérieur des cellules infectées (Steinmann et al., 2007) (H.-R. Lee et al., 2020). Elle pourrait également participer à la suppression de la réponse inflammatoire, facteur de la progression de la maladie hépatique viro-induite, dépendante du *tumor necrosis factor* α (TNFα) *via* une activation de STAT3 et de ERK (Convery et al., 2019).

1.3.3.2 La protéine non structurale 2

La protéine non structurale 2 (NS2), de 217 acides aminés (23 kDa) contient 3 ou 4 hélices transmembranaires, insérées dans la membrane du RE (Schregel et al., 2009). La fonction la plus connue de cette cystéine protéase est l'auto-clivage de la polyprotéine virale au niveau du site NS2/NS3. La fonction catalytique de NS2 est dépendante des 181 acides aminés situés dans le domaine N-terminal de la protéine virale NS3 (voir section 1.3.3.3) (Schregel et al., 2009). Au-delà de son activité de cystéine protéase, NS2 active la transcription de *sterol regulatory element binding protein 1C* (SREBP-1c) dans la lignée hépatocytaire Huh7, ce qui conduit à une activation de l'enzyme *fatty acid synthase* (FAS). Ces données suggèrent ainsi que NS2 pourrait contribuer à la stéatose hépatique induite par le VHC, observée fréquemment chez les patients infectés (Oem et al., 2008).

1.3.3.3 La protéine non structurale 3

La protéine non structurale 3 (NS3) de 631 acides aminés (70 kDa) contient un domaine N-terminal porteur de l'activité sérine protéase et NTPase ainsi qu'un domaine C-terminal responsable de l'activité ATPase et hélicase (Grakoui et al., 1993). Cette protéine catalyse la fixation et le déroulement de l'ARN au cours de la réplication virale. De la même manière que NS2 agit de concert avec la partie N-terminale de NS3 pour son auto-clivage, NS3 et NS4A coopèrent pour des clivages protéolytiques propres à la polyprotéine virale (NS3/NS4A ; NS4A/NS4B ; NS4B/NS5A et NS5A/NS5B) (Grakoui et al., 1993). La protéase NS3 peut aussi moduler le système immunitaire de la cellule hôte, notamment en ciblant une protéine de signal antivirale : *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS) qui active le *nuclear factor-kappaB* (NF-κB) responsable de l'activation des interférons de type I (IFN-I) (X.-D. Li et al., 2005, p. 3).

1.3.3.4 La protéine non structurale 4A

La protéine non structurale 4A (NS4A) est une petite protéine de 54 acides aminés (8 kDa), nécessaire à l'activité sérine protéase de NS3 (voir ci-dessus). NS4A interagit en outre avec la protéine NS5A, interaction essentielle à sa phosphorylation (Sarwar et al., 2011). Il a été montré, dans un contexte non réplicatif, que la protéine NS4A, en plus d'être localisée au RE, pouvait être détectée au niveau de la mitochondrie, seule ou en complexe avec la protéine NS3, et était responsable de l'induction de l'apoptose induisant une dérégulation de la balance Bax – Bcl-xl (Javed & Manzoor, 2018), Ces données concordent avec la présence d'hépatocytes en apoptose, observés chez des patients chroniquement infectés par le VHC. (Bantel & Schulze-Osthoff, 2003).

1.3.3.5 La protéine non structurale 4B

La protéine NS4B est composée de 217 acides aminés (27 kDa) et contient 4 domaines transmembranaires permettant son ancrage dans la membrane du RE. Ces domaines sont également importants pour le recrutement d'autres protéines non structurales (Welsch et al., 2007). La protéine NS4B est décrite comme responsable, à elle seule, de la formation de remaniements membranaires, support de la réplication virale : le *membranous web* (Egger et al., 2002) (voir section 1.6.4). Cette protéine virale semble également directement impliquée dans la réplication du génome viral puisque son domaine C-terminal contient des motifs de liaison à l'ARN qui lui permettent d'interagir avec la région 3' untranslated region (3'UTR) de l'ARN viral de polarité négative et, ainsi, de faciliter sa réplication (Einav et al., 2008). En outre et bien que les mécanismes sous-jacents soient inconnus, la protéine NS4B semble jouer un rôle critique dans le processus de phosphorylation et donc de la régulation

fonctionnelle de la protéine NS5A, impliquée dans la balance réplication/assemblage du VHC (voir section1.3.3.6). Par ailleurs, au-delà de son rôle dans le cycle viral, NS4B participerait à l'échappement au système immunitaire inné et dans la pathogenèse du VHC puisqu'elle possèderait une fonction de modulation de la voie IFN-médiée par le *Toll Like Receptor 3* (TLR3), en inhibant la protéine adaptatrice protéine *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-*β (TRIF) (Liang et al., 2018). Enfin, il a été montré, dans des lignées hépatocytaires, que l'expression de NS4B augmente l'expression de marqueurs spécifiques de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) comme la protéine Snail et favorisait ainsi la migration et l'invasion cellulaire (Hu et al., 2017). Ces données suggèrent ainsi un rôle potentiel de cette protéine virale dans la pathogenèse viro-induite et dans le développement du CHC en particulier.

1.3.3.6 La protéine non structurale 5A

La protéine non structurale 5A (NS5A) de 485 acides aminés est présente dans les cellules infectées sous deux isoformes : la forme phosphorylée de 56 kDa et la forme hyperphosphorylée de 58 kDa (He et al., 2006). Des acteurs viraux (NS4B, NS4A) mais également cellulaire (*Casein kinase A*α) ont été décrits comme modulateurs de ces deux isoformes (Kandangwa & Liu, 2019). L'état de phosphorylation de cette protéine est décrit comme un élément de régulation de la balance réplication / assemblage dans le cycle du VHC. Ainsi, il semble que la forme hyperphosphorylée de la protéine soit impliquée dans l'inhibition de la réplication virale (Kandangwa & Liu, 2019). A noter que cette modulation de la réplication virale peut aussi s'opérer directement dans la mesure où NS5A peut se fixer sur la région 3'UTR du génome du VHC (Kandangwa & Liu, 2019). NS5A peut du reste interagir directement avec la polymérase virale (NS5B) *in vitro* mais aussi *in vivo* et pourrait ainsi moduler son

activité enzymatique, centrale pour la réplication du génome viral (He et al., 2006). Comme évoqué précédemment (voir section 1.3.2.1), NS5A est recrutée, par la protéine core à la surface des GLs au cours du cycle viral, il a ainsi été avancé NS5A pourrait être importante dans l'initiation de l'assemblage des particules virales en rapprochant, spatialement, la protéine core et l'ARN viral (Galli et al., 2013).

1.3.3.7 La protéine non structurale 5B

La protéine non structurale 5B (NS5B ; 591 résidus ; 68 kDa) est probablement la protéine virale la mieux caractérisée. Cette ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) assure la synthèse de l'ARN simple brin de polarité positive à partir d'un intermédiaire de réplication (ARN sb de polarité négative) (Simister et al., 2009). Les 530 aa de la région N-terminale forment le complexe catalytique qui présente une organisation « doigt, paume, pouce » caractéristique des RdRp (Moradpour & Penin, 2013). Les 21 résidus C-terminaux assurent du reste l'ancrage post-traductionnel de NS5B aux membranes, et l'orientation cytosolique de son complexe catalytique (Moradpour & Penin, 2013). L'absence d'activité correctrice *ou proof reading* de cette protéine, est responsable d'erreurs dans la séquence nucléotidique de l'ARN viral néo-synthétisé, favorisant alors l'émergence de quasi-espèces virales au sein d'un individu infecté (voir section 1.4) (Perales, 2020).

Enfin, cette RdRp est la cible de certaines molécules antivirales dont les activités sont détaillées section 1.5 (Traitements et limites).

1.4 Variabilité génétique du VHC

Le VHC est soumis à une forte variabilité génétique, en raison principalement de l'absence d'activité *proof reading* de la polymérase virale NS5B (voir section ci-dessus). De fait, un fort taux de substitutions G : U / U : G (environ 10^{-3} à 10^{-5} erreurs par site) a été décrit (Powdrill et al., 2011). Il existe 7 génotypes du VHC, qui diffèrent dans leurs séquences nucléotidiques de 25 à 35%. De plus, 67 sous-types ont également été décrits, différant entre eux de 15 à 25%. Enfin, chez chaque patient infecté, des populations virales génétiquement différentes bien qu'apparentées circulent et sont nommées quasi-espèces virales (Gomez et al., 1999).

Les mutations sont majoritairement observées dans la région HVR2 de la glycoprotéine d'enveloppe E2 mais également dans la séquence codant la protéine NS5A, impactant respectivement la réponse immune humorale et les traitements anti viraux (voir section 1.5) (Tsukiyama-Kohara & Kohara, 2017).

La répartition géographique des différents génotypes viraux est variable en fonction des régions du globe (**Figure 6**). Parmi les 7 génotypes viraux décrits, le génotype 1

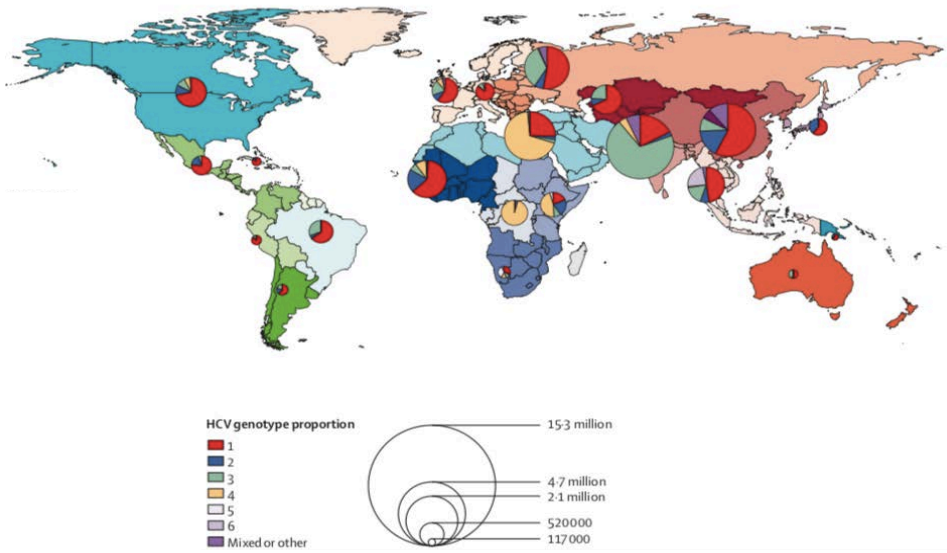


Figure 6. Répartition géographique des différents génotypes du VHC et nombres d'infections totales. *D'après The Polaris Observatory HCV Collaborators. 2017.*

y est majoritaire (46,2% des cas d'infection) et ceci dans la plupart des régions du globe. Notons que les proportions les plus élevées d'infections par les génotypes 4 et 5 sont décrites dans les pays en voie de développement (Messina et al., 2015).

1.5 Traitements et limites

Au cours de ces dernières années, le développement d'antiviraux à action directe (AADs) a été une révolution dans la prise en charge thérapeutique des infections à VHC (G. Li & De Clercq, 2017). Ces AADs ciblent directement les protéines virales et ne présentent que peu d'effets secondaires. En plus de leur simplicité d'administration (quelques comprimés par jours pendant 8 à 12 semaines), les AADs sont extrêmement efficaces et permettent ainsi d'obtenir une réponse virologique soutenue (RVS – charge virale indétectable 12 semaines après la fin du traitement) chez 98% des patients traités (Alavian et al., 2016). Il existe 3 classes d'AADs : (i) les inhibiteurs de protéase NS3/4A qui inhibent le clivage protéolytique de la polyprotéine virale, (ii) les inhibiteurs de NS5A permettant à la fois d'inhiber la formation du complexe de réplication viral mais aussi de bloquer l'assemblage et la sécrétion du virus, (iii) les inhibiteurs de polymérase virale NS5B, se liant aux sites catalytiques de la polymérase virale NS5B, interrompant ainsi la synthèse de l'ARN viral (G. Li & De Clercq, 2017). Les différentes classes et catégories de ces antiviraux à action directe sont présentées ci-dessous (**Figure 7**).

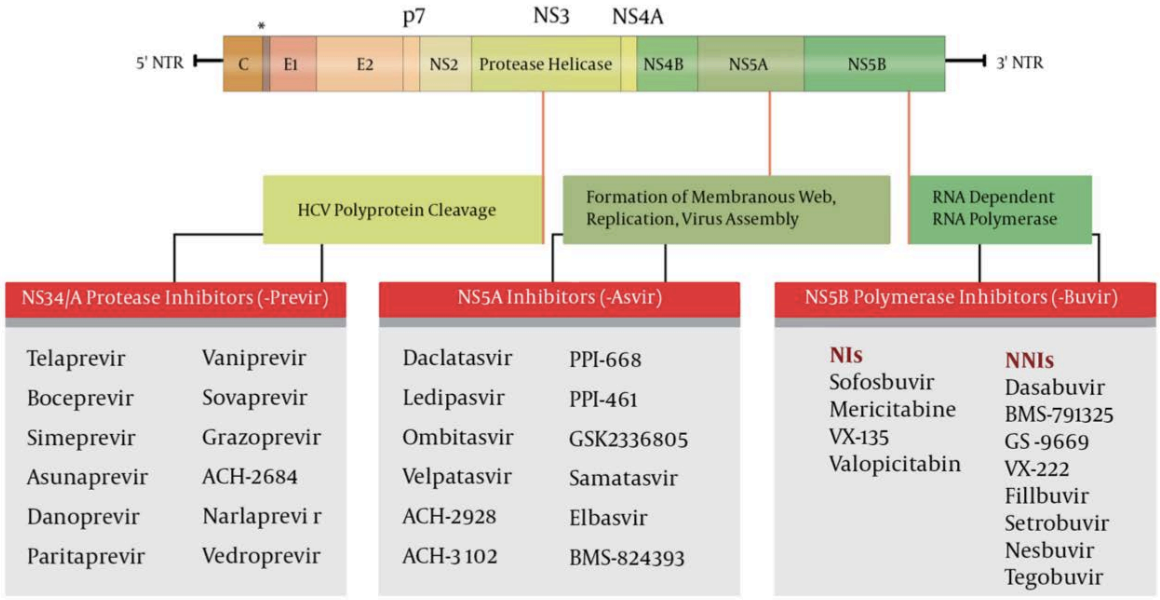


Figure 7. Classification des antiviraux à action directe (AADs) selon leur cible virale. *Sont représentés des exemples de molécules de chaque classe ainsi que leurs cibles. NIs : inhibiteurs nucléosidiques. NNIs : inhibiteurs non nucléosidiques. Adapté de Alavian et al., 2016.*

L'utilisation de ces traitements en combinaison les uns avec les autres a montré une meilleure efficacité et permet de favoriser leur caractère pan-génotypique (G. Li & De Clercq, 2017) Ainsi, en s'appuyant sur l'efficacité de ces nouveaux traitements, l'OMS a mis en place un programme d'éradication du VHC à l'horizon 2030 (WHO. Combating Hepatitis B and C to reach elimination by 2030. Geneva, Switzerland. 2016).

Cependant plusieurs facteurs semblent rendre cet objectif difficilement atteignable. D'abord, un modèle prédictif a établi que seulement 9 pays (Australie, France, Irlande, Italie, Japon, Corée du Sud, Espagne, Suisse et Angleterre) sur les 45 inclus dans l'étude sont en voie d'atteindre ces objectifs et que 30 pays ne les atteindront pas avant au moins 2050 (Razavi et al., 2019). (**Figure 8**)

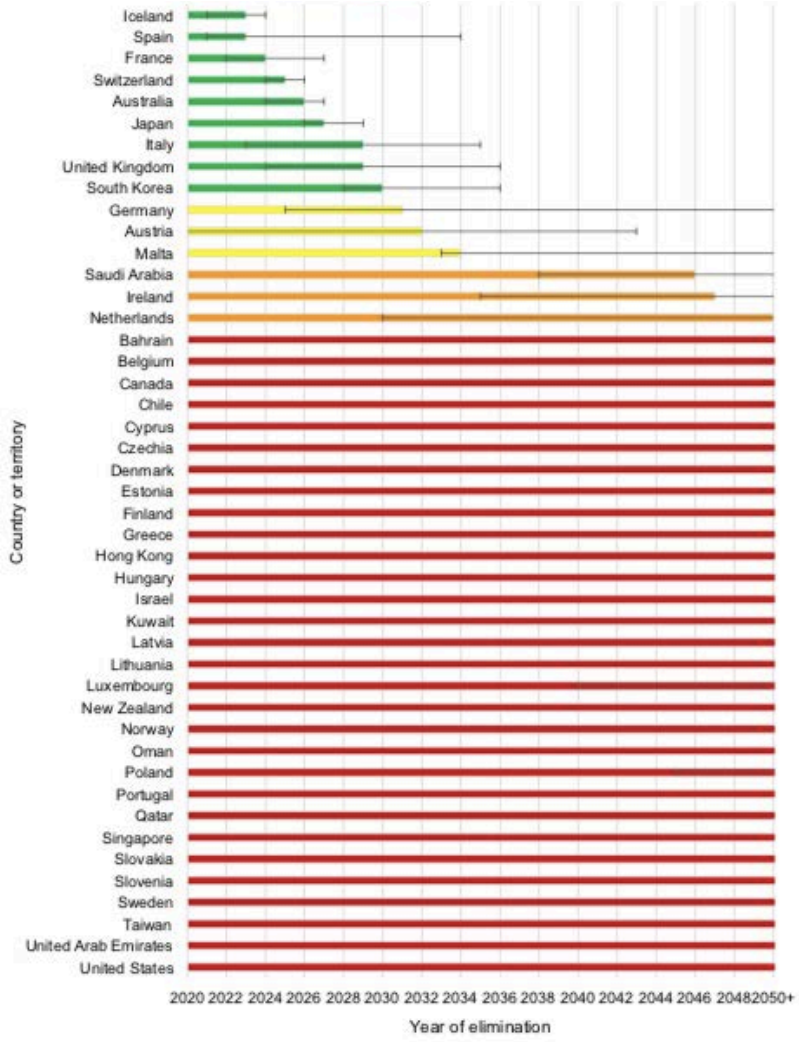


Figure 8. Prédiction de l'année d'atteinte de l'objectif d'élimination du VHC, fixé par l'OMS. *D'après Razavi et al., 2019*

Cet objectif semble effectivement difficilement atteignable en absence d'un vaccin prophylactique efficace puisque, comme évoqué dans la section 1.2.2, une très faible proportion des patients infectés sont diagnostiqués et donc traités (environ 25% en France (Brouard et al., 2015) et jusqu'à 80% à l'échelle mondiale). Du reste, parmi les patients diagnostiqués seulement 7 à 13% ont accès aux AADs (OMS. *Global Hepatitis report* 2017).

Diverses études soulignent en outre l'existence de plusieurs sous-types viraux résistants aux inhibiteurs de NS5A. Un travail de Childs *et al*., publiée en 2019 met en avant que certains patients infectés par des sous-types inhabituels du génotype 1

(G1e, G1g, G1l ou encore G1p) traités avec des inhibiteurs de NS5A ne présentent une RVS que de 75% alors qu'elle est de 100% pour les patients infectés avec les sous-types les plus répandus du génotype 1 (G1a et G1b) (Childs et al., 2019). Une autre étude réalisée sur une cohorte de 537 patients français, infectés par le VHC et traités par les AADs a montré un taux d'échec thérapeutique de 40% chez les patients infectés par un sous-type minoritaire G4r du génotype 4 (Fourati et al., 2019). Il semble que ces échecs de traitement soient dus à l'existence de sous populations virales contenant des substitutions associées à la résistance dans la séquence codant la protéine NS5A. Ces mutations ont été décrites comme préexistantes aux traitements (Pawlotsky, 2019).

Du reste, l'élimination du virus (ou la réduction drastique de la charge virale) par les AADs ne semble pas protéger du risque de développement du CHC lorsque la maladie hépatique est avancée (Hamdane et al., 2019; Ogawa et al., 2020). En effet, l'étude d'une cohorte de patients chroniquement infectés par le VHC et traités par une combinaison Sofosbuvir / Inhibiteur de NS5A a montré la persistance d'altération de la réponse immune 1 an après élimination du virus (Lopez Angel et al., 2021). Ces altérations sont décrites comme participant à l'entretien de l'inflammation hépatique chronique, contributeur majeur du développement du CHC. L'ensemble de ces données souligne la nécessite de poursuivre les investigations concernant le VHC et particulièrement celles concernant l'étude du cycle viral, encore incomplètement caractérisé.

1.6 Cycle viral et lipides cellulaires

Le VHC présente des particularités en termes de relation avec des structures lipidiques cellulaires lui permettant de réaliser son cycle intracellulaire complet (Vieyres & Pietschmann, 2019). Ces interactions sont présentes à tous les stades du cycle viral. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux lipoprotéines de très basse densité [*Very Low Density Lipoproteins* (VLDL)] et aux GLs (Bassendine et al., 2013), acteurs majeurs de l'assemblage et de la morphogenèse du VHC, étapes tardives du cycle viral, qui seront abordées ultérieurement (section1.6.5 et 1.6.6).

1.6.1 Lipides cellulaires impliqués dans les étapes tardives du cycle du VHC

1.6.1.1 Biogenèse et sécrétion des VLDL

Les VLDL sont des lipoprotéines de grande taille (jusqu'à 200nm de diamètre) et de très faible densité (<1,006 g/mL) synthétisées par le foie. Elles assurent le transport des triglycérides et des esters de cholestérol vers les tissus périphériques (Illingworth, 1993). Lorsqu'elles sont hydrolysées dans le plasma par la lipoprotéine lipase, elles donnent naissance à d'autres lipoprotéines de densité plus importante, les *intermediate density lipoproteins* (IDL) et les *low density lipoproteins* (LDL). Les VLDL sont ainsi constituées d'un noyau composé de lipides neutres (triglycérides et esters de cholestérol), entouré d'une monocouche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées des apolipoprotéines B-100, CI, CII, CIII et E (ApoB-100, ApoCI, ApoCII, ApoCIII et ApoE, respectivement) (Mahley et al., 1984). Ces dernières permettent de structurer la VLDL mais participent également à la spécificité de transport des lipides neutres vers leurs tissus de destination par interaction avec des récepteurs cellulaires. L'ApoB-100 et l'ApoE peuvent ainsi interagir avec le récepteur des LDL (LDL-R) à la

surface des hépatocytes (Illingworth, 1993). La structure d'une VLDL est présentée en **Figure 9**.

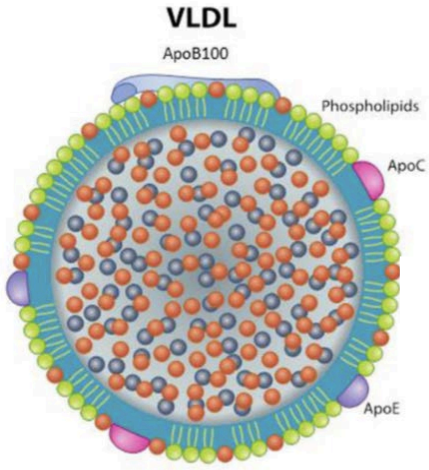


Figure 9. Représentation schématique de l'organisation d'une VLDL. *Les VLDL sont composées d'un noyau de triglycérides (billes bleues) et d'esters de cholestérol (billes orange), entourés d'une monocouche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées les apolipoprotéines ApoB-100, ApoE, ApoAI et ApoCI, II et III. D'après Helkin et al., 2016*

La biogenèse des VLDL se déroule dans la lumière du RE, en deux étapes. Premièrement, l'ApoB-100 néosynthétisée et transloquée dans la lumière du RE est alors partiellement lipidée, donnant naissance à une VLDL primaire, faiblement lipidée. Dans un second temps, la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP ou MTTP) assure le transfert de lipides neutres dans la VLDL (Rustaeus et al., 1999; Swift, 1995). Le mouvement de la VLDL depuis la lumière du RE vers le compartiment *cis*-Golgi est un prérequis à sa sécrétion à l'extérieur de l'hépatocyte. Ce transfert est assuré par des vésicules nommées *VLDL transfer vesicules* (VTV) qui sont décrites comme des vésicules *coat protein complexes II* (COPII).

Ces vésicules, qui bourgeonnent à partir de la membrane du RE, contiennent diverses protéine (Sar1, GTPase, Sec23/24p et Sec13/31p) (Gusarova et al., 2003; Siddiqi, 2008). Les VTV peuvent fusionner avec la membrane du golgi (**Figure 10**), et une fois libérées dans la lumière du golgi, l'ApoB-100 est glycosylée (Tran et al., 2002) et phosphorylée (Swift, 1996).

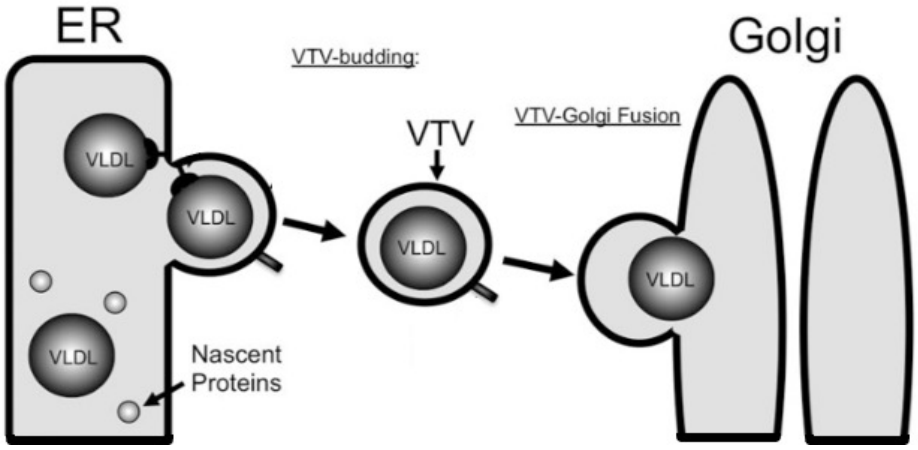


Figure 10. Représentation schématique du transport des VLDL depuis la lumière du RE vers le compartiment *cis*-golgien. *Les VLDL sont transportées dans des VLDL transfer vesicles (VTV) qui bourgeonnent à partir de la membrane du RE. Ces vésicules fusionnent ensuite avec la membrane du golgi et libèrent alors les VLDLs. Modifié d'après Tiwari et Siddiqi. 2012.*

C'est également dans ce compartiment que l'ApoE est incorporée dans les VLDL, qui sont sujettes à une lipidation additionnelle (Bamberger & Lane, 1990; Higgins, 1988; Hossain et al., 2014). Le transport des VLDL matures depuis le *trans*-Golgi vers la membrane plasmique et ainsi vers l'espace extracellulaire est encore peu décrit. Hossain et collaborateurs ont cependant montré que ce transfert était assuré par des *post-transgolgi network VLDL transport vesicles* (PTG-VTV) (Hossain et al., 2014). Les auteurs ont décrit ces PTG-VTV comme de larges vésicules de 300 à 350 nm de diamètre, entourées d'une membrane lipidique. Ces vésicules ne contiennent pas la protéine Sar1, présente dans les VTV, responsable du transfert des VLDL du RE vers

le golgi, mais contiennent la protéine SNAP23, impliquée dans le transport du *trans*-golgi vers la membrane plasmique. Les auteurs ont en outre montré que ces PTG-VTV étaient capables de fusionner avec la membrane plasmique cellulaire.

1.6.1.2 Gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques (GLs) sont des organelles de stockage des lipides conservées au sein du monde vivant. Elles sont effectivement décrites aussi bien chez les levures que chez les eucaryotes supérieurs (Walther et al., 2017). Structurellement, ces organelles ressemblent à des lipoprotéines. Elles sont en effet composées d'un noyau de lipides neutres (triglycérides et esters de stérol) entouré d'une monocouche de phospholipides. Cette simple membrane contient également une grande proportion de protéines (Fujimoto & Parton, 2011) (**Figure 11A**). Le protéome des GLs est variable en fonction du type cellulaire étudié et entre 100 et 150 protéines différentes associées aux GLs ont été identifiées pour les cellules de mammifères (Bersuker et al., 2018). Ces protéines peuvent être classées en deux groupes : 1) les protéines de classe I, qui sont présentes à la fois au niveau du RE et des GLs, sont transférées depuis la membrane du RE vers la GLs *via* des structures appelées ponts membranaires qui relient les deux structures ; 2) Les protéines de classe II sont quant à elles recrutées à la surface des GLs depuis le cytosol, par des mécanismes peu décrits. Il pourrait s'agir d'interactions avec d'autres protéines résidentes de la surface des GLs ou d'interaction avec la monocouche de phospholipides (Pour revue, Vieyres & Pietschmann, 2019). Une grande majorité de ces protéines sont des enzymes impliquées dans la régulation de la biogenèse des GLs (Wilfling et al., 2013).

Les GLs sont des organelles dynamiques, alternant entre croissance et hydrolyse, en fonction des réserves lipidiques intracellulaires disponibles. Ainsi, dans des conditions de surplus de nutriments, les lipides produits sont stockés dans ces organelles. Cette source d'énergie peut également être mobilisée par hydrolyse enzymatique du noyau lipidique, médiée par des lipases ou bien par une forme d'autophagie spécifique des lipides, la lipophagie (Olzmann & Carvalho, 2019).

La description de la biogenèse des GLs est aujourd'hui non exhaustive. Il est cependant assumé qu'elle démarre entre les feuillets interne et externe de la membrane du RE (**Figure 11B).**

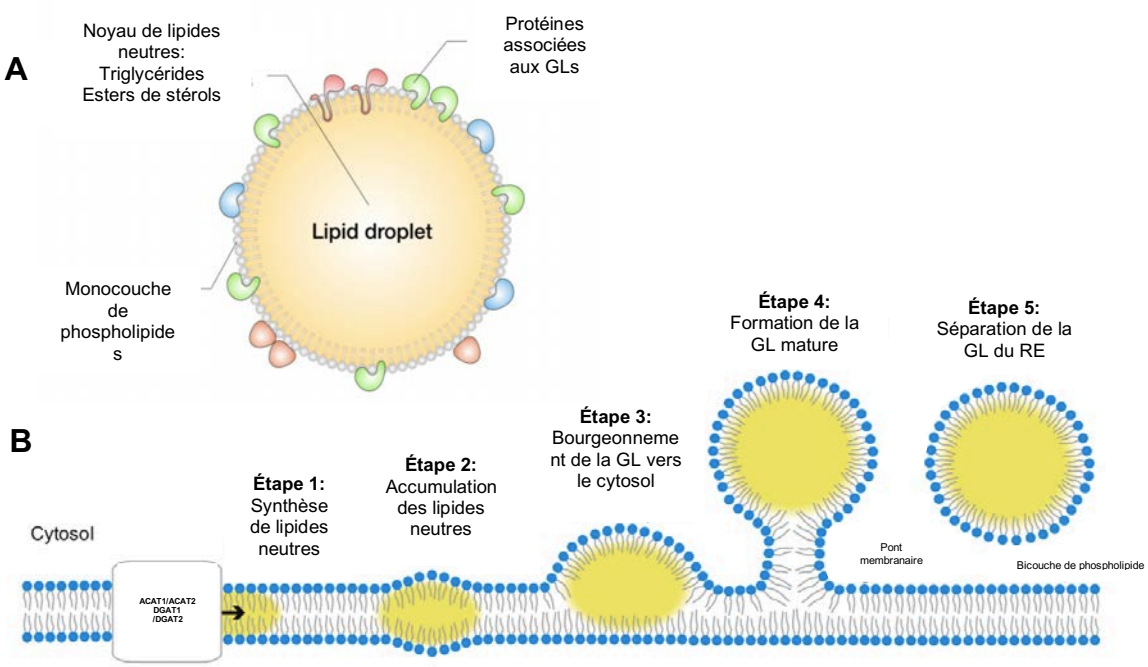


Figure 11. Structure et biogenèse des GLs. ***(A)*** *Représentation schématique de la structure d'une gouttelette lipidique (GL ou Lipid droplet) (****B****) La synthèse des GLs débute entre les deux feuillets de la membrane du RE est peut être résumée en 5 étapes. Étape 1 : Les lipides neutres sont synthétisés dans la lumière du RE, grâce notamment aux enzymes Acyl-CoA : cholesterol O-acyltransferase 1 et 2 (ACAT1 et ACAT2) et diacylglycerol acyltransferase 1 et 2 (DGAT 1 et DGAT2). Étape 2 : Les lipides neutres s'accumulent entre les deux feuillets de la bicouche de phospholipides du RE. Étape 3 : La GL en cours de formation bourgeonne vers le cytosol. Étape 4 : La GL néoformée, mature reste en contact avec la membrane du RE via un pont membranaire ou est complètement détachée de celle-ci (Étape 5). À noter que sur ce schéma les protéines associées aux GLs ne sont volontairement pas représentées. Modifié d'après Nettebrock et Bohnert. 2020*

C’est en effet là que la synthèse des triglycérides ainsi que celle des esters de stérols prend place *via* les enzymes diacylglycerol acyltransferase 1 et 2 (DGAT1 et DGAT2) et acyl-CoA :cholesterol O-acyltransferase 1 et 2 (ACAT1 et ACAT2, respectivement) (Vieyres & Pietschmann, 2019). Ces lipides s’accumulent alors entre les deux feuillets membranaires, et cette expansion se poursuit en un bourgeonnement de la GLs vers le cytoplasme. Cette étape, et notamment la direction du bourgeonnement, semble contrôlée, au moins en partie, par des protéines résidentes de la membrane du RE, appartenant à la famille des *fat storage-inducing transmembrane* (FIT). Une déplétion de deux membres de cette famille (FIT1 et FIT2) inhibe en effet le bourgeonnement des GLs (Choudhary et al., 2015). Une fonction similaire a également été décrite, dans un modèle levure pour une protéine de la famille des Perilipines (Pln1), associées aux GLs, sans avoir été confirmée en cellules de mammifères (Gao et al., 2017). La croissance des GLs, après leur bourgeonnement, se réalise soit par fusion avec d’autres GLs, soit par transfert de triglycérides ou encore par synthèse de triglycérides directement à leur surface (Wilfling et al., 2013). Une partie seulement des GLs se détachent complètement du RE, et bien que les mécanismes complets gouvernant ce phénomène ne soient aujourd’hui pas décrits, ce détachement est réversible, c’est à dire qu’une GLs détachée du RE peut y retourner, par l'intermédiaire du complexe COPI (Wilfling et al., 2013, 2014).

1.6.2 Ultrastructure et organisation de la particule virale du VHC

Les particules virales du VHC sont uniques dans leur structure chez les virus décrits jusqu’à aujourd’hui. En effet, il s’agit de particules hybrides, nommées

lipoviroparticules (LVPs) et composées à la fois des constituants viraux mais aussi de ceux d'une VLDL (voir section 1.6.1.1) (Andre et al., 2002; Merz et al., 2011) (**Figure 12**).

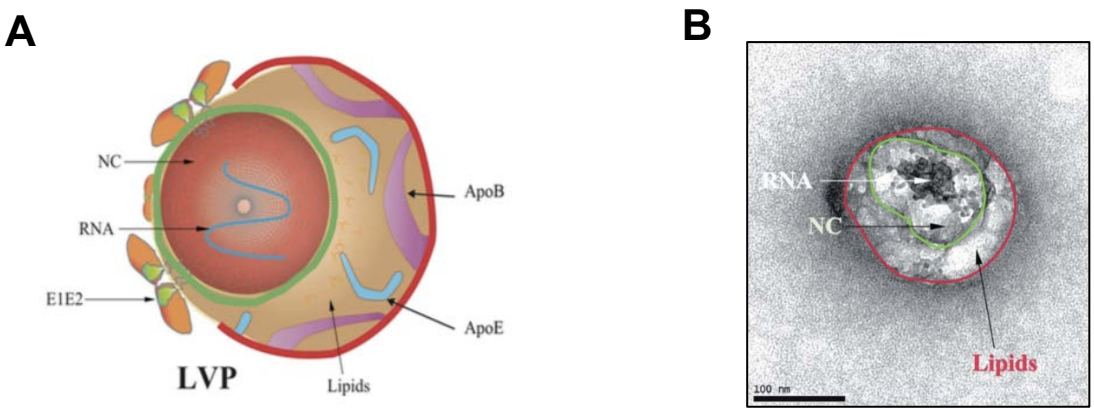


Figure 12. Organisation de la particule virale du VHC. (***A***) *Représentation schématique prédite. Les glycoprotéines d'enveloppe sont représentées en orange (E2) et vert (E1**).** La nucléocapside est délimitée en vert et le manteau lipidique en rouge. NC : Nucléocapside (**B**) Observation au microscope électronique à transmission (MET JEOL 1230) d'une LVPs isolée à partir d'un sérum de patient chroniquement infecté par le VHC. NC : Nucléocapside**.** Barre d'échelle : 100nm (D'après Piver et al., 2017).*

Ainsi, la nucléocapside et les hétérodimères de glycoprotéines d'enveloppe sont entourés d'un manteau lipidique constitué de lipides neutres (esters de cholestérol et triglycérides) dans lequel sont enchâssées des apolipoprotéines E, B100 mais également AI, CI, CII et CII (ApoE, ApoB100, ApoA1, ApoCI, ApoCII et ApoCIII, respectivement) (Merz et al., 2011; Wrensch et al., 2018). Cette lipidation de la particule virale lui confère une très faible densité (entre 1,03 et 1,1 g/mL) bien inférieure à celles des particules virales des autres virus enveloppés à ARN (**Table 1**) (Lindenbach & Rice, 2013). Il semble que cette composition lipidique de la particule virale non seulement participe activement au mécanisme d'entrée (voir section 1.6.3) mais aussi à l'échappement au système immunitaire (Fauvelle et al., 2016). La visualisation de LVPs isolées à partir de sérum de patients infectés a permis de mettre

en évidence que ces particules sont hétérogènes en taille (de 40 à 140nm de diamètre) et ne semblent pas adopter de symétrie spécifique ni de l'enveloppe, ni de la capside (Piver et al., 2017)

Table 1. Densité des particules virales des virus enveloppés à ARN*.*
D'après Lindenbach et Rice. 2013

	Buoyant density range (g/ml)*	
Enveloped RNA Viruses		
HCV	1.03–1.10	
Pestiviruses	1.12–1.15	
Flaviviruses	1.20–1.23	
Alphaviruses	1.19–1.22	
Rubiviruses	1.18–1.19	
Arteriviruses	1.13–1.17	
Retroviruses	1.16–1.18	
Bornaviruses	1.18–1.22	
Rhabdoviruses	1.18–1.20	
Bunyaviruses	1.16–1.18	

1.6.3 Mécanisme d'entrée des particules virales dans les cellules cibles

L'entrée des particules du VHC dans les hépatocytes est un processus complexe mettant en jeu un grand nombre de facteurs d'attachement, de récepteurs et de corécepteurs cellulaires. Les hépatocytes humains étant des cellules polarisées, c'est

au niveau du pôle basolatéral qu'est initiée l'étape d'entrée virale. L'attachement initial des particules virales à la surface des cellules cibles est médié dans un premier temps par l'interaction entre l'ApoE présente sur la particule virale et les glycosaminoglycanes (GAGs) des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG). De plus, une liaison entre l'ApoB100 et l'ApoE de la LVP et le récepteur des *low density lipoproteins* (LDL-R) participe à cet attachement précoce (Lindenbach & Rice, 2013).

À ce jour, plusieurs récepteurs et corécepteurs cellulaires du VHC ont été décrits : *Cluster of Différentiation 81* (CD81), *Scavanger Receptor Class B Type I* (SR-B1), Claudine 1, et Occludine (Miao et al., 2017). Le CD81 a été le premier récepteur identifié (Pileri, 1998), cette protéine de la famille des tétraspanine est exprimée de manière ubiquitaire à la surface des cellules et interagit directement avec le domaine *CD81 binding loop* de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (Gerold et al., 2020). Ce domaine étant masqué par la région HRV1, des modifications conformationnelles préalables de E2 sont nécessaires à l'interaction avec le CD81. SR-B1 est une protéine largement exprimée dans les hépatocytes et possède un rôle de liaison aux HDL, aux VLDL et aux formes oxydées des LDL. SR-B1 est ainsi impliqué dans l'import du cholestérol contenu dans ces lipoprotéines (Zahid et al., 2013). En se liant aux apolipoprotéines présentent à la surface de la particule virale, l'activité de transfert de lipides de SR-B1 modifie la composition lipidique du virion. Une liaison de SR-B1 avec la région HVR1 de la glycoprotéine d'enveloppe E2 s'établit. Elle permet d'exposer la *CD81 binding loop* de E2, initiant alors la liaison de la particule virale au CD81 (Thi et al., 2012). Les protéines Claudine 1 et Occludine sont deux protéines des jonctions serrées n'interagissant pas directement avec le VHC mais étant essentielles aux étapes post-liaison au CD81 (Harris et al., 2010). La formation d'un complexe VHC-CD81-Claudine 1 est un prérequis à la poursuite de l'entrée virale. Cependant,

Claudine 1 et Occludine sont majoritairement localisées aux jonctions serrées du pôle apical des hépatocytes alors que l'interaction VHC-CD81 prend place au pôle basolatéral. Il semble donc qu'un "glissement" latéral de ce complexe s'opère le long de la membrane plasmique (Evans et al., 2007). En effet, l'interaction du virus avec CD81 active l'*epithelial growth factor receptor* (EGFR) conduisant à un réarrangement du réseau d'actine sous membranaire permettant alors la diffusion latérale du complexe jusqu'au pôle apical (Brazzoli et al., 2008) (**Figure 13**).

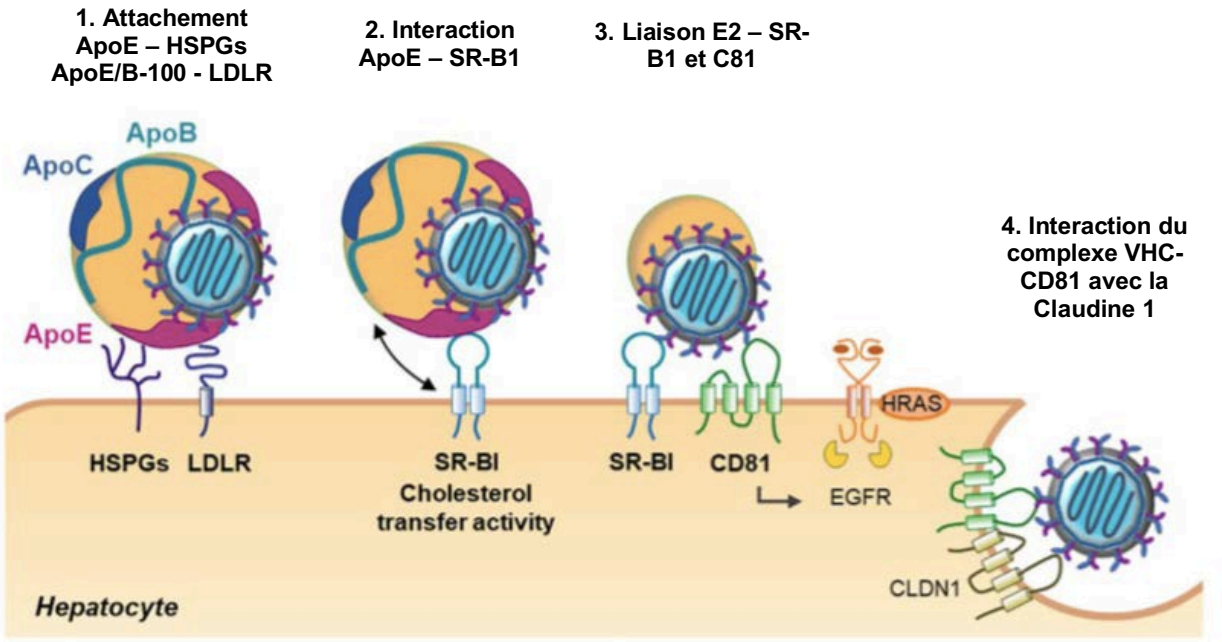


Figure 13. Entrée du VHC dans les hépatocytes. ***1.*** *Les particules virales s'attachent à la surface des hépatocytes avec une faible affinité, via une interaction de l'ApoE et les Héparanes Sulfate Protéoglycanes (HSPGs) et le récepteur des LDL (LDLR).* ***2****. ApoE à la surface de la LVP interagit avec SR-B1, activant l'activité de transfert du cholestérol de SR-B1.* ***3.*** *SR-B1 se lie à la région hypervariable 1 de la glycoprotéine d'enveloppe E2 démasquant sur celle-ci le domaine CD81 binding loop, permettant ainsi la liaison de E2 à CD81.* ***4****. Un mouvement latéral du complexe VHC-CD81 au niveau des jonctions serrées est initié par l'activation du recepteur de l'EGF (EGFR) et conduit àl' interaction de la Claudine 1 (CLDN1). (D'après Wrensch et al., 2018)*

Ce rapprochement spatial des récepteurs du VHC est nécessaire à l'initiation de l'étape d'endocytose dépendante de la clathrine et de l'actine (Blanchard et al., 2006). L'acidification du compartiment endosomal est alors responsable de modifications

conformationnelles, démasquant le peptide de fusion putatif de la glycoprotéine d'enveloppe E1 (voir section 1.3.2.3). Ce peptide de fusion putatif est inséré dans la membrane endosomale, ce qui initie la fusion avec l'enveloppe virale, libérant ainsi le génome du VHC dans le cytosol (Miao et al., 2017).

1.6.4 Réplication du génome viral

Après sa libération dans le cytoplasme de la cellule hôte, l'ARN du VHC est pris en charge par la machinerie traductionnelle cellulaire. La traduction est alors initiée après fixation de la sous unité ribosomale 40S cellulaire sur la séquence *Internal ribosome site entry* (IRES) située dans la région 5'UTR du génome viral (Moradpour et al., 2007). La polyprotéine alors produite est clivée par des protéases cellulaires et virales (voir section 1.3.1). Concomitamment à la traduction virale, la synthèse des nouveaux ARN viraux est assurée par l'ARN polymérase virale NS5B, qui reconnaît la région 3'UTR du génome viral et synthétise un intermédiaire de réplication, l'ARN sb de polarité négative, lui-même utilisé comme matrice pour la production du génome viral (Suzuki, 2017). Bien que la protéine NS5B joue un rôle majeur évident dans cette étape de réplication, la protéase NS3, au-delà de son activité de clivage de la polyprotéine semble, de par son activité hélicase (hNS3), également importante pour la synthèse de l'ARN viral (Gu & Rice, 2010). Il apparaît possible que la hNS3 assure la dissociation de l'ARN viral hautement structuré avant la synthèse par la protéine NS5B (Tabata et al., 2020). D'autre part, l'état de phosphorylation de la protéine NS5A (voir section 1.3.3.6) régule l'activation ou la répression de la réplication virale (Moradpour & Penin, 2013). L'état hyperphosphorylé de NS5A est associée à une répression de la réplication, en abolissant ses interactions avec des facteurs cellulaires favorisant la

réplication du génome viral tels que la phosphatidylinositol-4 Kinase III α (PI4K IIIα) (K. L. Berger et al., 2011), ou le *human vesicle-associated membrane protein-associated protein* A (hVAP-A) (Evans et al., 2004).

De même que pour les autres étapes du cycle viral, la réplication du génome du VHC est partiellement dépendante des lipides cellulaires. Il a ainsi été montré que l'inhibition ou la déplétion de l'Acetyl-CoA carboxylase, enzyme catalysant la synthèse du manoyl-CoA depuis l'actétyl-CoA, ou de la 17-betahydroxysteroide dehydrogenase de type 12 (HSD17B12), enzyme catalysant l'élongation des acides gras à très longues chaînes, conduisait à une réduction drastique des quantités intracellulaires de l'ARN du VHC (Mohamed et al., 2020; Narayanan et al., 2016). La HSD17B12 semble également intervenir dans la réplication du virus Zika (ZIKV) et du virus de la Denuge (DENV) (Mohamed et al., 2020), suggérant que le rôle joué par le métabolisme lipidique dans la réplication du VHC pourrait être étendue plus largement aux virus de la famille des *Flaviviridae*.

À l'instar d'autres virus de la famille des *Flaviviridae*, comme le ZIKV, le DENV, le virus West-Nile (WNV), le *Tick-borne Encephalitis Virus* (TBEV) ou plus largement d'autres virus à ARN simple brin de polarité positive, comme le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 1 (SARS-Cov1), le VHC induit des remaniements membranaires massifs au cours de son cycle (Romero-Brey & Bartenschlager, 2014). Des exemples de remaniements membranaires, induits par certains virus de la famille des *Flaviviridae* sont présentés en **Figure 14**. Dans le cas du VHC, il s'agit majoritairement d'une accumulation de vésicules à double membrane avec un diamètre moyen de 150 nm, bien que quelques grandes vésicules à simple membrane (environ 800 nm de diamètre) aient également été observées (Ferraris et al., 2010). Ces structures viro-induites, dérivées de la membrane du RE, sont ainsi décrites

comme étant le support de la réplication du génome viral et nommées "complexe de réplication" ou encore *membranous web*. Il est en effet possible de détecter, au microscope électronique à transmission (MET), au sein de ces complexes de réplication, les protéines non structurales du VHC, mais également les ARN sb positifs et négatifs (Ferraris et al., 2010; Gosert et al., 2002).

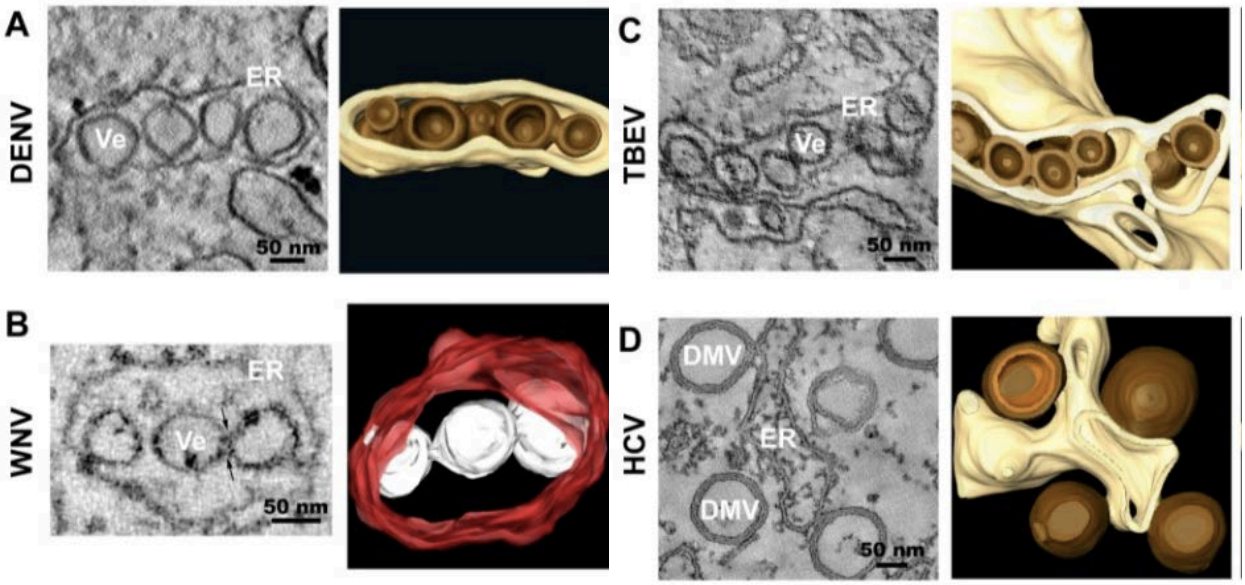


Figure 14. Réarrangements membranaires caractéristiques supportant la réplication de différents virus de la famille des *Flaviviridae.* *Observation au microscope électronique à transmission (panel de gauche) et reconstitution 3D après tomographie (panel de droite) de cellules infectées par le virus de la Dengue (DENV) (**A**), le virus West-Nile (WNV) (**B**), le Tick-Borne Encephalitis virus (TBEV) (**C**) et par le virus de l'hépatite C (VHC) (**D**). Les organelles de réplication (Ve) du DENV, WNV et TBEV correspondent à des invaginations de la membrane du RE. Les vésicules à double membranes (DMV), observées dans les cellules infectées par le VHC sont au contraire des protrusions de la membrane du RE vers le cytosol. Sur les reconstitutions 3D, le RE est représenté en jaune (DENV, TBEV et HCV) ou en rouge (WNV) et les organelles de réplication en marron (DENV, TBEV et HCV) ou en blanc (WNV). D'après Romero-Brey et Bartenschlager. 2014.*

Les mécanismes déterminants la genèse de telles structures sont encore mal décrits. Il semble cependant que l'expression seule de la protéine NS4B en culture cellulaire soit capable d'induire leur formation (Egger et al., 2002). Des images réalisées au MET de cellules infectées par le VHC et traitées par des dérivés du Daclatasvir (inhibiteur de NS5A), ont montré une absence de complexe de réplication, suggérant également

une implication de NS5A dans leur formation sans que les mécanismes précis n'aient été identifiés (C. Berger et al., 2014).

1.6.5 Assemblage

Les étapes tardives du cycle viral (*i.e*. assemblage et morphogenèse) visent à former une nouvelle particule virale entière et infectieuse. Les GLs jouent un rôle prépondérant dans cette étape du cycle viral et sont décrites comme la plateforme d'assemblage supposée du VHC. Ainsi, après clivage de sa forme immature, par la *signal peptidase* et la *signal peptide peptidase*, la forme mature de la protéine core est relocalisée depuis la membrane du RE vers la surface des GLs (Miyanari et al., 2007). Des mutations au sein du domaine D2 mènent à une rétention de la protéine core à la membrane du RE mais également à la diminution drastique de la production de particules virales infectieuses (Shavinskaya et al., 2007), soulignant d'une part que le domaine D2 est nécessaire à cette relocalisation de core autour des GLs et d'autre part que celle-ci est indispensable à l'assemblage du VHC (Boulant et al., 2007). L'enzyme DGAT1, requise pour la synthèse des triglycérides stockés dans les GLs, interagit avec la protéine core et permet alors sa relocalisation autour des GLs. Il a en outre été montré, dans une lignée dérivée d'hépatocarcinome transduite avec un *short hairpin* ARN (shARN) ciblant la DGAT1, que la localisation de core autour des GLs ainsi que la production de particules virales infectieuses étaient significativement diminuées (Herker et al., 2010). Un phénomène similaire a par ailleurs été décrit pour la protéine de capside du DENV. Ainsi, Samsa et collaborateurs ont montré qu'après infection de cellules hépatiques humaines ou de cellules de moustiques, la protéine core du DENV s'accumule autour des GLs (Samsa et al., 2009). Les auteurs ont en outre démontré que l'inhibition de ce phénomène, par mutagenèse dirigée dans la séquence de la protéine core, diminuait fortement la production de particules virales.

Ces données suggèrent qu'à l'instar du VHC, le DENV dépend fortement des GLs pour réaliser son cycle infectieux.

La protéine NS5A du VHC est également observée autours des GLs *in vitro* (Miyanari et al., 2007). Il semble cependant que core soit recrutée avant NS5A sur cet organelle puisque l'introduction de mutations inhibant le transfert de core aux GLs abolit également celui de NS5A (Miyanari et al., 2007). En plus de se lier à l'ARN viral, NS5A peut interagir avec core (Masaki et al., 2008) mais également avec différentes protéines de surface des GLs telles que Rab18 (Salloum et al., 2013) ou la *PAT-protein TIP47* (Vogt et al., 2013). Ces différentes interactions pourraient faciliter le transfert de NS5A sur les GLs. Comme évoqué dans la section 1.3.3.6, NS5A est une phosphoprotéine et la phosphorylation d'un résidus sérine particulier dans son domaine C-terminal par la *casein kinase II*α (CKIIα) est essentielle à l'assemblage du VHC. En effet, la mutation de cette sérine conduit à une inhibition de la production de virions infectieux sans pour autant moduler la réplication du génome viral (Tellinghuisen et al., 2008). NS5A peut du reste interagir avec ApoE et cette association a été décrite comme nécessaire à l'assemblage du VHC (Benga et al., 2010).

L'initiation de l'assemblage et de la réplication de l'ARN viral se déroule dans des compartiments cellulaires différents. Or, il apparaît évident que la protéine core, l'ARN viral, et les dimères de glycoprotéines d'enveloppe doivent être simultanément présents dans un espace restreint pour former une particule virale. Il a ainsi été montré que l'interaction de la protéine core avec l'*adipose differentiation-related protein* (ADRP), une protéine de surface des GLs, mène à une diminution de l'expression de l'ADRP, aboutissant au déplacement des GLs vers les sites de réplication *via* le réseau de microtubule (Boulant et al., 2007). À partir de cette étape, deux modèles ont été

proposés : a) l'assemblage de la nucléocapside pourrait débuter directement à la surface de la GL, grâce à un recrutement de l'ARN viral médié par la NS5A, elle aussi présente sur cette même GL (Bartenschlager et al., 2011) ; b) la protéine de capside est de nouveau recrutée au niveau de la membrane du RE, à proximité des sites de réplication, où l'initiation de la formation de la nucléocapside pourrait se dérouler (Lindenbach & Rice, 2013; Vieyres & Pietschmann, 2019). Il est encore aujourd'hui délicat de discriminer ces deux modèles, certainement en raison de la difficulté d'observer les particules virales intracellulaires du VHC en microscopie électronique à transmission et de les distinguer des VLDL intracellulaires. Enfin, l'étape d'enveloppement de la nucléocapside est peu décrite mais semble avoir lieu au niveau du RE, spatialement proche des GLs (Bartenschlager et al., 2011).

1.6.6 Morphogenèse / Sortie des particules virales néo-formées

Si l'assemblage des particules virales est dépendant des GLs, les étapes suivantes du cycle du VHC (Morphogenèse et sortie des particules virales) sont, elles, dépendantes de la voie de sécrétion des VLDL (Shimotohno, 2021). Ainsi, l'ApoE a été décrite comme indispensable pour les étapes du cycle viral post-enveloppement (K.-S. Chang et al., 2007; J.-Y. Lee et al., 2014). À l'inverse, ApoB-100 semble importante mais non indispensable pour ces étapes (Jiang & Luo, 2009). L'inhibition de la MTP, responsable de la maturation des VLDL est du reste associée à une abolition de la production de particules virales (H. Huang et al., 2007). Le déroulement précis de ces dernières n'est toujours pas complétement identifié, plusieurs hypothèses ont ainsi été proposées. Il est en effet possible qu'après le bourgeonnement des particules virales à la membrane du RE, les esters de cholestérol et les triglycérides (qui composent le

manteau lipidique des LVPs) soient incorporés à la particule virale. Il est également envisageable que les particules virales nouvellement formées puissent fusionner avec des VLDL en formation (Cosset et al., 2020). En accord avec cette dernière hypothèse, il a été montré que les particules virales néo-formées étaient transportées vers le golgi dans des vésicules COPII, à la manière des VLDL (Syed et al., 2017). Enfin, plusieurs arguments en faveur d'une maturation extracellulaire des LVPs ont été avancés. En effet, les LVPs contiennent, entre autres, de l'ApoB-48 qui est produite par les entérocytes (Diaz, 2006). Il n'a pas été montré que ces cellules produisent elles-mêmes des particules virales du VHC. En revanche, il n'est pas inenvisageable que cette association ApoB-48/LVPs se déroule dans le milieu extracellulaire. D'ailleurs, un travail récent montre que l'incubation avec des sera humains de virions du VHC produits *in vitro* augmente d'une part leur lipidation mais également leur infectiosité (Denolly et al., 2019). Les auteurs suggèrent que l'albumine humaine pourrait être un facteur important contribuant à la maturation extracellulaire des particules du VHC.

Étant donné le lien étroit qui existe entre les étapes tardives du cycle du VHC et la voie de synthèse des VLDL, il est raisonnable de penser que les particules virales néoformées du VHC empruntent cette voie de sécrétion pour leur production hors des hépatocytes infectés. Cette voie de production virale n'est, à ce jour, pas entièrement établie mais un certain nombre d'arguments expérimentaux permettent de construire quelques hypothèses. Ainsi, il semble que cette sécrétion des virions du VHC soit dépendante de la clathrine. Sa déplétion inhibe aussi bien la sécrétion des particules virales que celle de l'ApoB-100 et de l'ApoE, étayant l'hypothèse selon laquelle le VHC emprunterait la voie de sortie des VLDL (Benedicto et al., 2015). Une étude contradictoire a cependant montré que la délétion des protéines adaptatrices du réseau du *trans*-Golgi inhibait la sécrétion des particules virales sans pour autant

entraver celle des triglycérides, de l'ApoB-100 ou de l'ApoE suggérant que la sortie des virions du VHC pourrait être indépendante de la voie de sécrétion des VLDL (Mankouri et al., 2016). Enfin, les conclusions tirées de ces différentes études doivent être interprétées avec précautions. En effet, les modèles de culture utilisés classiquement pour l'étude du VHC présentent un métabolisme lipidique altéré, et sécrètent notamment des VLDL faiblement lipidées (Podevin et al., 2010; Yamamoto et al., 1987). Cette caractéristique pourrait donc être un frein à la compréhension fine des étapes tardives du cycle viral.

1.7 Modèles cellulaires d'étude du VHC

1.7.1 Les hépatocytes humains en culture primaire

Les hépatocytes humains en culture primaire (*primary human hepatocytes* - PHH) sont classiquement isolés à partir de la partie saine d'une résection de tumeur hépatique humaine primaire ou métastatique. Ces cellules "physiologiques" sont le modèle d'étude *in vitro* le plus proche d'une infection naturelle. Ils possèdent en effet, au moment de leur isolement , un niveau de différenciation inégalé au sein des différents modèles d'étude *in vitro* du VHC (Steenbergen et al., 2013). Plusieurs études ont par ailleurs déjà établi que ces cellules étaient permissives à l'infection par le VHC, avec un clone viral adapté à la culture cellulaire (VHCcc, voir section 1.8.4) (Podevin et al., 2010) ou avec un isolat de patient infecté (HC^{Ser},voir section 1.8.1) (Gondeau et al., 2014; Pageaux et al., 1998). Malgré les atouts qu'ils présentent, les PHH ne sont que rarement utilisés, principalement du fait de la difficulté d'obtention de ces cellules. En plus de l'importante variabilité inter-donneurs des métabolismes cellulaires (notamment lipidique), les PHH perdent rapidement leur statut de cellules différenciées lorsqu'elles sont conservées en culture (Steinmann & Pietschmann, 2013). Enfin, la

faible permissivité de ces cellules à l'infection par le VHC, associée à une réplication virale limitée sont un frein supplémentaire à leur utilisation courante pour l'étude *in vitro* du VHC. Plusieurs améliorations de ce modèle ont pourtant été apportées. Lagaye et collaborateurs ont ainsi développé un système *ex vivo* de coupes de foies humains, conservant un haut niveau de différenciation après 10 jours de culture. Ce modèle, permissif à l'infection par des VHCcc mais également par des VHC^{Ser}, permet la production de particules virales extracellulaires plus infectieuses que celles produites par des PHH (Lagaye et al., 2012). Les auteurs justifient ce meilleur pouvoir infectieux par la structure tridimensionnelle de leur modèle, constitué en outre de l'ensemble des acteurs cellulaires hépatiques (hépatocytes, cellules de Küpffer, endothélium hépatique, etc…). Cependant, bien que prometteur, ce modèle est d'une très grande complexité de mise en œuvre, semble perdre son caractère différencié rapidement, et ne permet donc pas un usage courant pour les études virales. Enfin, la co-culture de PHH avec fibroblastes de souris, a montré un haut niveau d'expression de marqueurs de différenciation hépatique pendant plusieurs semaines, tout en supportant une réplication virale pendant au moins 2 semaines (Khetani & Bhatia, 2008; Ploss et al., 2010). Néanmoins ces co-cultures ont été développées sur de petits formats de culture (plaque de culture 24 puits), limitant ainsi les études de grande ampleur et sont longues à mettre en place (plusieurs semaines) (Khetani & Bhatia, 2008).

1.7.2 Les cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites ou *induced pluripotent stem cells* (iPSC) sont des cellules non différenciées pouvant être reprogrammées *in vitro* en diverses

cellules à haut niveau de différenciation. Les iPSC sont ainsi obtenues à partir de cellules somatiques (cellules non germinales et non embryonnaires), exposées à différents facteurs tels que l'*octamer-binding transcription factor 3/4* (Oct 3/4), le *SYR-box transcription factor 2* (SOX-2), le *Kruppel-like factor 4* (Klf4) ou encore c-Myc (Takahashi et al., 2007). Ces cellules reviennent alors à un état non différencié et peuvent être reprogrammées en n'importe quel type cellulaire en fonction des facteurs de croissance et cytokines utilisés. L'utilisation de cellules souches embryonnaires, ne nécessitant pas cette dédifférenciation est restreinte du fait des contraintes éthiques qu'elle impose. Ces cellules sont en effet obtenues à partir d'embryons humains. Plusieurs équipes ont rapporté la reprogrammation d'iPSC vers des *Hepatocytes-like cells* (HLC), après une vingtaine de jours de traitement par un cocktail de facteurs de croissance et de cytokines spécifiques (Z. Song et al., 2009; Takahashi et al., 2007; Touboul et al., 2010). Ces cellules expriment alors divers marqueurs d'hépatocytes matures [récepteur de l'asialoglycoprotéine (Schwartz et al., 2012; Yoshida et al., 2011), la tyrosine aminotransférase, l'alpha-1 antitrypsine, le facteur nucléaire hépatocytaire 4 et 6 (HNF4 et HNF6)] et assurent également des fonctions d'hépatocytes comme le stockage du glycogène, ou encore l'absorption des LDL (Touboul et al., 2010). Les HLC obtenues à partir d'iPSC sont permissives à l'infection et supportent un cycle complet du VHC, qu'il soit adapté à la culture cellulaire ou isolé de sera de patients infectés (Schwartz et al., 2012; Yoshida et al., 2011). Les HLC sont, au même titre que les PHH (Zhang et al., 2020), également permissives à l'infection par le VHB (Shlomai et al., 2014), suggérant que leur utilisation pourrait être étendue à d'autres virus hépatotropes. À ce jour, peu de HLC dérivées d'iPSC ont été développées pour l'étude du VHC. L'obtention et la caractérisation de ces cellules est en effet longue et complexe. Il semble également que la différenciation hépatocytaire

des HLC ne soit pas complète, ces cellules conservent en effet certains marqueurs de cellules non différenciées comme l'alpha-foetoprotéine (AFP) et semblent également exprimer plus faiblement certains marqueurs de différenciation comparé à des hépatocytes (Z. Song et al., 2009). Il semble en outre qu'une certaine hétérogénéité soit observée dans la qualité des HLC en fonction des clones d'iPSC, exprimant ainsi des taux variables d'albumine ou de cytochrome P450 (Z. Song et al., 2009). Enfin, l'infection d'HLC par le VHC mène à une très faible production de particules virales, (Bengrine, 2016; X. Zhou et al., 2014), certainement en raison d'une réponse immunitaire efficace. Zhou et collaborateurs ont ainsi montré que cette production virale pouvait être améliorée dans ces cellules en inhibant la voie JAK/STAT, abolissant alors la réponse interféron (X. Zhou et al., 2014).

1.7.3 Les lignées cellulaires dérivées d'hépatocarcinomes

Les lignées cellulaires dérivées d'hépatocarcinomes humains sont le modèle cellulaire de référence pour les études *in vitro* du VHC. Ces cellules sont facilement cultivables et, pour certaines, hautement permissives à l'infection par le VHC. Ainsi, la lignée Huh7.5, dérivée de la lignée Huh7, est parmi les plus permissives à l'infection par le VHC. Cette lignée, a été obtenue après traitement de la lignée Huh7 portant un réplicon sub génomique du VHC (voir section 1.8.1), par des interférons de type I (IFN-I) (Aly et al., 2012). Cette lignée est partiellement défective pour la réponse immunitaire innée, du fait d'une mutation dans le gène codant la protéine RIG-1, impliquée dans la reconnaissance par le système immunitaire des cellules infectées par un virus (Sumpter et al., 2005) ce qui participe à leur forte permissivité à l'infection par le VHC. La lignée HepG2, à l'inverse n'est pas naturellement permissive à l'infection par le

VHC et nécessite l'expression ectopique de certains récepteurs et facteurs de réplication pour pouvoir supporter un cycle viral complet (Q. Li et al., 2016). Cette lignée présente néanmoins l'avantage de pouvoir facilement se polariser en culture cellulaire (Mee et al., 2009) et d'ainsi mimer plus fidèlement la structure d'un hépatocyte. Cependant, un niveau de réplication plus faible que dans la lignée Huh7 et clones dérivés est généralement observé dans ces cellules (Narbus et al., 2011). A noter que la lignée Huh7, ses clones dérivés et les cellules HepG2 ne sont pas les seuls modèles cellulaires à disposition. D'autres lignées sont également capables de supporter la réplication du VHC telles que les lignées Huh6, (Windisch et al., 2005) Li23, mais dans une moindre mesure (N. Kato et al., 2009).

L'ensemble des lignées cellulaires citées ci-dessus présentent la même limite, elles sont toutes plus ou moins éloignées de l'état de différenciation d'un hépatocytaire primaire. Elles sont toutes en effet issues de tumeurs hépatiques qui se caractérisent, entre autres, par un niveau variable de dédifférenciation cellulaire. Le niveau d'expression de divers marqueurs de différenciation y est ainsi très significativement plus faible que dans des PHH (Steenbergen et al., 2013). En outre, ces lignées sont partiellement défectives pour la biogenèse des VLDL, capitale pour la morphogenèse du VHC (voir section 1.6.6) (Podevin et al., 2010), limitant de fait les études fines des étapes tardives du cycle viral. Pour preuve, les particules virales produites par ces lignées cellulaires présentent des différences nettes avec celles isolées de sérum de patients infectés ou produites par des cellules primaires d'hépatocytes. Au laboratoire, Piver et collaborateurs ont montré, par une approche originale de microscopie électronique (qui sera présentée dans les sections suivantes), que les virus isolés de patients sont entourés d'un manteau lipidique épais et ainsi présentent une taille globale plus importante que ceux produits par la lignée Huh7.5 en culture standard

(Piver et al., 2017). Il a également été montré que les virus produits par les PHH ont une densité globale plus faible mais une infectiosité bien supérieure à ceux produits en cellules Huh7.5.1 (clone dérivé de la lignée Huh7.5). De manière intéressante, cette densité faible et infectiosité élevée des virus produits en PHH est abolie lorsque ces mêmes virus sont utilisés pour ré-infecter des cellules Huh7.5.1, soulignant ainsi que ces caractéristiques virales ont bien pour origine le système de culture utilisé (Podevin et al., 2010). Les lignées dérivées d'hépatocarcinomes ne sont du reste, pour des raisons inconnues, pas infectables par des virus isolés de patients.

Afin de pallier ces limites, plusieurs études ont proposé des améliorations à ce modèle en induisant une re-différenciation partielle de différentes lignées permissives à l'infection par le VHC. Sainz et Chisari ont ainsi développé un modèle dans lequel la lignée Huh7 retrouve certaines caractéristiques (quiescence, augmentation de la quantité de l'ARNm de l'Albumine etc…) d'un hépatocyte différencié après 20 jours de traitement à 1% (vol/vol) de dimethylsulfoxide (DMSO) (Sainz & Chisari, 2006). Les auteurs ont de plus montré que l'infection de cette culture par le VHC se poursuivait efficacement et durablement (au moins 62 jours). L'effet du DMSO sur l'état de différenciation de différentes lignées cellulaires (hépatiques ou non) a déjà été décrit, bien que les mécanismes exacts soient toujours inconnus (Bauhofer et al., 2012; Cheung et al., 2006; Hino et al., 1999). L'ajout de faibles concentrations en DMSO dans le milieu de culture est par ailleurs utilisé classiquement pour la culture et la production *in vitro* du virus de l'Hépatite B (Glebe et al., 2001; M. Zhou et al., 2017). Avec ce même objectif, Steenbergen et collaborateurs ont mis au point la re-différenciation de la lignée Huh7.5 *via* une exposition de 21 jours à du sérum humain (Steenbergen et al., 2013). Les résultats montre que l'expression de divers marqueurs de différenciation hépatocytaire (alpha-1 antitrypsine, récepteur des LDL et albumine)

est nettement potentialisée dans les cellules Huh7.5 cultivées en présence de sérum humain comparée à celle obtenue avec des cellules cultivées en présence de sérum de veau fœtal (SVF). La supplémentation en sérum humain mène également à une augmentation massive des contenus cellulaires en GLs et restaure également partiellement la sécrétion de VLDL riches en triglycérides et en cholestérol. Il semble donc que la différenciation cellulaire favorise au moins deux acteurs lipidiques fondamentaux pour les étapes tardives du cycle du VHC. Ainsi, les cellules traitées avec du sérum humain et infectées par le VHC produisent des particules virales plus infectieuses, moins denses et plus associées à l'ApoB-100 que celles produites par des cellules Huh7.5 cultivées avec du SVF. La reproduction de ces résultats reste néanmoins délicate compte tenu de la grande variabilité biochimique des sera humains utilisés. Les conséquences sont que, à l'inverse de l'emploi du DMSO qui est une molécule unique et standardisée, les cultures cellulaires baignent dans un milieu hétérogène, non maitrisé, et sont donc sujettes à de fortes variabilités aux tests biologiques, directement imputables aux différentes origines des sera humains employés.

1.8 Les modèles viraux

1.8.1 Les sera de patients infectés par le VHC

Les sera de patients infectés par le VHC (VHC^{Ser}) représentent le modèle viral idéal pour l'étude *in vitro* du VHC puisqu'il doit mimer l'environnement sérique infectieux. Cependant, leur utilisation est restreinte aux PHH et au HLC puisque, pour des raisons inconnues, les lignées dérivées d'hépatocarcinomes ne sont pas permissives à ces inocula. (Gondeau et al., 2014; Molina et al., 2008; Schwartz et al., 2012) Les VHC^{Ser}

permettent d'étudier au plus près des conditions physiologiques la complexité d'une infection par la quasi-espèce virale. Les faibles niveaux de réplication, comparés au VHCcc, sont cependant un frein à leur utilisation (Gondeau et al., 2014). Le succès de l'infection de PHH par les VHC^{Ser} semble de plus aléatoire (environ 30%) et n'apparaît corrélé ni à la charge virale ni au génotype du virus de l'échantillon (Gondeau et al., 2014). Il semble cependant que les sera les plus infectieux contiennent significativement moins d'IFNα et d'interleukine 8 (IL-8), suggérant ainsi que les facteurs anti-viraux intra-sériques dépendant de l'hôte soient plus déterminants pour le succès ou l'échec de l'infection que les facteurs viraux.

1.8.2 Les réplicons sub génomiques du VHC

Les réplicons sub génomiques permettent d'étudier spécifiquement la réplication du VHC et ont été, jusqu'au début des années 2000, le modèle de référence d'étude *in vitro* du VHC. Le premier réplicon sub génomique a été développé par Lohmann et collaborateur en 1999 (Lohmann, 1999). Ainsi, le génome viral, isolé à partir d'un sérum de patient infecté a été cloné dans un vecteur d'expression et toute la région codant les protéines structurales (core, E1 et E2 mais également p7 et NS2) a été remplacée par un gène de résistance à la néomycine (Néo) ou par un gène rapporteur. L'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) est également ajouté en plus de l'IRES du VHC, ils contrôlent la traduction des protéines NS3 à NS5B et Néo, respectivement. Une représentation schématique de cette construction est présentée **Figure 15**. La transfection de ce réplicon sub génomique, après linéarisation et transcription *in vitro*, en cellules Huh7 permet alors uniquement l'expression des protéines non structurales, nécessaires à la synthèse de nouveaux génome viraux

tronqués (Lohmann, 1999) (Steinmann & Pietschmann, 2013). Dans le début des années 2000, Kato et collaborateurs ont développé un réplicon sub génomique ayant une très forte capacité de réplication (T. Kato et al., 2003). Cette construction a été obtenue par clonage du génome viral depuis le sérum d'un patient japonais ayant développé une hépatite c fulminante (clone *Japanese fulminent hepatitis* – JFH1). Ce clone particulier servira par la suite de base au système de culture *in vitro* du VHC (voir section 1.8.4).

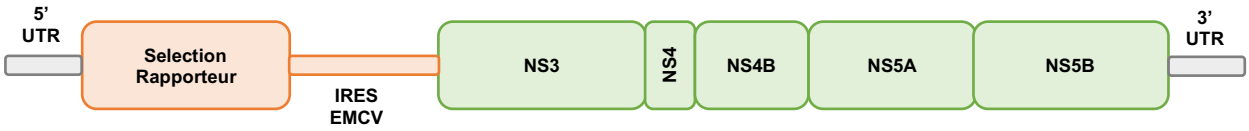


Figure 15. Représentation schématique d'un réplicon sub génomique du VHC. *Les réplicons sub génomiques sont construits à partir de la séquence d'un génome viral entier isolé d'un patient. Dans un réplicon sub génomique, la région représentée en orange, codant les protéines structurales ainsi que la protéine p7 et NS2 sont remplacées par un gène de sélection (souvent un gène de résistance à la néomycine) ou un gène rapporteur (Luciférase, green fluorescent protein (GFP) etc.) La traduction des protéines non structurales (de NS3 à NS5B) est contrôlée par l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (IRES EMCV) alors que celle du gène de sélection / rapporteur est contrôlé par l'IRES du VHC, situé dans la région 5'UTR. D'après Bartenschlager. 2006).*

1.8.3 Les particules virales pseudotypées du VHC

Les particules virales pseudotypées du VHC (VHCpp) permettent d'étudier spécifiquement l'entrée cellulaire du VHC. Elles sont produites après co-transfection de cellules *human embryonic kidney* 293T (HEK 293T) par 3 vecteurs plasmidiques : le premier codant les glycoprotéines d'enveloppe du VHC E1 et E2, un second codant les protéines gag (capside) et pol (polymérase) d'un rétrovirus [VIH ou *murine leukemia virus* (MLV)] et enfin un vecteur codant un gène rapporteur, comme la

luciférase ou la GFP (Bartosch et al., 2003; Hsu et al., 2003). Les cellules HEK 293T produisent alors des particules virales dont le génome rétroviral codant le gène rapporteur est contenu dans une capside (d'origine rétrovirale). Dans l'enveloppe de phospholipides d'origine cellulaire qui entoure cette structure sont enchâssés les hétérodimères de glycoprotéines d'enveloppe du VHC. Ces particules virales peuvent alors servir à infecter des cellules d'origine hépatocytaire. Après libération de la nucléocapside virale dans le cytosol, la séquence nucléotidique codant le gène rapporteur est intégrée dans le génome de la cellule hôte qui l'exprime, permettant de quantifier précisément l'entrée des VHCpp dans la cellule cible. Ces particules sont encore un outils précieux pour évaluer l'efficacité neutralisante d'anticorps sériques isolés (Riva & Dubuisson, 2019).

1.8.4 Les VHC adaptés à la culture cellulaire

Le développement de virus adaptés à la culture cellulaire (VHCcc) dans le début des années 2000 a été une révolution dans l'étude *in vitro* du VHC (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005), puisqu'à l'inverse des deux systèmes cellulaires présentés précédemment, ce modèle permet d'étudier l'intégralité du cycle viral. Wakita et collaborateurs ont ainsi décrit un protocole de production de particules virales infectieuses du VHC basé sur le clonage du génome d'un virus isolé d'un patient japonais atteint d'une hépatite C fulminante (*japanese fulminent hepatitis* – JFH1) consécutive à une infection par un virus du génotype 2a. Ce clone avait été identifié quelques années auparavant par Kato et collaborateurs pour le développement de réplicons sub-génomiques (voir section 1.8.2) . Les auteurs avaient alors constaté que le réplicon de ce clone particulier permettait un haut niveau de réplication sans que

des mutations génomiques adaptatives soient nécessaires à sa culture (T. Kato et al., 2003). Ainsi, pour la production de VHCcc du clone JFH1, le génome viral complet a finalement exprimé par transfection en cellules Huh7 (ou clones dérivés). Le surnageant récolté après plusieurs jours post-transfection contenait alors des particules du VHC capables d'infecter des cellules naïves (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005). Le clone JFH1 a été, dans les années suivantes, optimisé par sélection de mutations adaptatives dans les séquences codant les protéines non structurales, améliorant grandement le pouvoir infectieux des particules virales sécrétées (Kaul et al., 2007; Russell et al., 2008). Ce clone demeure aujourd'hui le plus utilisé, car le plus répandu et en raison de son pouvoir infectieux élevé (Kaul et al., 2007). Le VHCcc JFH1 présente néanmoins le désavantage de n'être que peu représentatif de la physiopathologie du VHC. Les hépatites C fulminantes, contrairement aux hépatites B fulminantes sont, en effet, très rares, voire exceptionnelles (Ichai & Samuel, 2019). Le génotype 2a n'est, du reste pas le génotype du VHC le plus représenté à la surface du globe. De nombreux efforts ont été réalisés depuis pour étendre ce système VHCcc à d'autres génotypes viraux. La transfection du génome du clone H77S (génotype 1a) en cellules Huh7.5 permet ainsi la production de particules virales infectieuses ; les titres viraux obtenus sont cependant 100 à 1000 fois plus faibles que ceux obtenus avec le clone JFH1 (Yi et al., 2006). Plusieurs équipes ont également développé des virus VHCcc chimériques, composés d'une partie du génome de JFH1 (généralement codant les protéines non structurales) et de celle codant les protéines structurales d'un autre génotype viral (Mateu et al., 2008; Scheel et al., 2008). Ces constructions, variant dans la nature de leur enveloppe, permettent notamment d'étudier *in vitro*, à l'aide d'anticorps neutralisants, les différences de la réponse humorale aux infections de différents

génotypes dans un contexte viral plus fidèle à l'infection naturelle que les VHCpp jusqu'alors disponibles.

II. Hypoxie intra-hépatocytaire, VHC et Flavivirus

2.1 Structure hépatique et oxygénation naturelle

Le foie est un organe majeur assurant des fonctions vitales pour l'organisme telles que la synthèse des facteurs de coagulation, l'élimination des xénobiotiques, ou encore la synthèse des acides gras (Pour revue, Trefts et al., 2017). Il est composé de plusieurs types cellulaires : les hépatocytes, les cholangiocytes, les cellules stellaires, les cellules de Küpffer et les cellules endothéliales sinusoïdales, qui participent à l'organisation hépatique en unités structurelles nommées lobules hépatiques. Ces derniers sont organisés en travées d'hépatocytes, édifiés en hexagones autour de la veine centro-lobulaire. La triade porte, composée du canal biliaire, de la veine porte et

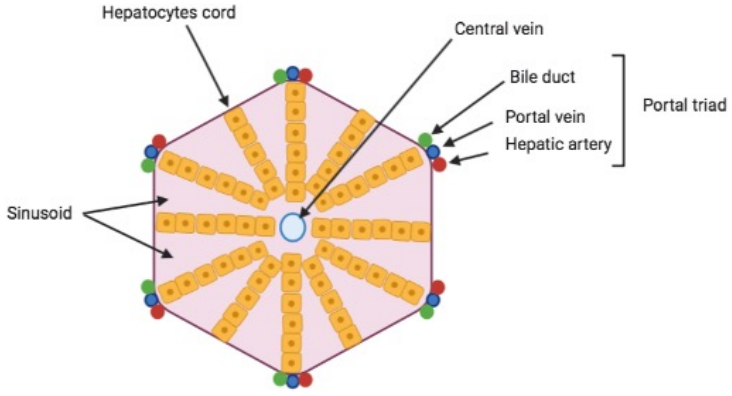


Figure 16. Représentation schématique de l'organisation d'un lobule hépatique. *Le lobule hépatique, de forme hexagonale est composé d'une alternance de travées d'hépatocytes (orange) et de sinusoïdes (rose). Au centre du lobule se trouve la veine centro-lobulaire (bleu clair) alors qu'aux sommets du lobule se trouve la triade porte composée du canal biliaire (vert), de la veine porte (bleu foncé) et de l'artère hépatique (rouge). D'après Treft et al., 2017.*

de l'artère hépatique, est située aux sommets des lobules (**Figure 16**) (Stenvall et al., 2014). Le sang enrichi en oxygène provenant de l'artère hépatique se mêle au sang riche en nutriments dans le sinusoïde, à mesure qu'il approche de la veine centro-lobulaire. La composition du sang dans le sinusoïde évolue donc au cours de son trajet vers le centre du lobule hépatique. Les cellules utilisent l'oxygène et les nutriments, générant des déchets métaboliques, et créant ainsi un gradient d'oxygène et de nutriments dans le sinusoïde (**Figure 17**) (Trefts et al., 2017).

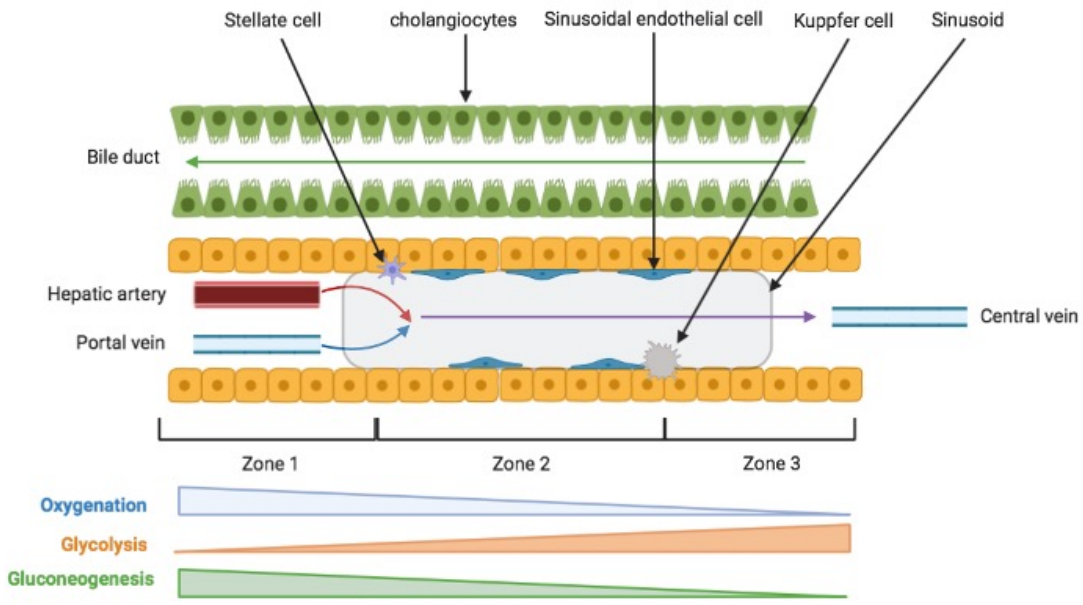


Figure 17. Gradient d'oxygène dans le lobule hépatique. *Le sang riche en oxygène provenant de l'artère hépatique se mêle au sang riche en nutriments provenant de la veine porte dans le sinusoïde. Au cours de son trajet vers la veine centro-lobulaire (central vein sur le schéma), la composition du sang change et s'appauvrit en oxygène et en nutriments, créant alors un gradient d'oxygène dans le lobule hépatique. Ce gradient permet de définir 3 zones au sein du lobule, la zone 1 ou périportale, proche de la triade porte dans laquelle l'oxygénation est la plus forte, la zone 2 ou zone médiane et la zone 3 ou centro-lobulaire autour de la veine centro-lobulaire dans laquelle l'oxygénation est la plus faible. Ainsi, la zone périportale est plutôt spécialisée dans la gluconéogenèse alors que la zone centro-lobulaire assure la glycolyse. D'après Treft et al., 2017.*

Ce gradient d'oxygène permet de définir 3 zones dans le lobule hépatique : (i) la zone 1 ou périportale, située à proximité de la triade porte, dans laquelle l'oxygénation est la plus élevée, (ii) la zone 2 ou médiane, (iii) la zone 3 ou centro-lobulaire, autour de la veine centro-lobulaire où l'oxygénation est la plus faible. Au même titre que dans la plupart des tissus du corps humain, le taux d'oxygène hépatique mesuré (par capteurs polarographiques ou optiques) est plus faible que celui atmosphérique, mesuré au niveau de la mer [21% O_2 (vol/vol)]. (Carreau et al., 2011) Il varie entre 8% O_2 (vol/vol) dans la zone périportale et 3% O_2 (vol/vol) dans la zone centro-lobulaire, définissant ainsi l'hypoxie comparativement au niveau atmosphérique (normoxie) (Carreau et al., 2011; Jungermann & Kietzmann, 2000). Ces 3 zones ne sont pas seulement structurelles, elles sont aussi fonctionnelles. Les fonctions hépatiques ne sont en effet pas réparties équitablement au sein des 3 zones (Gebhardt et al., 2007).

La gluconéogenèse est ainsi plus importante dans la zone 1 que dans les deux autres zones. Certaines enzymes de la synthèse du glucose comme la *phosphoenol pyruvate carboxylase* (PCK1), la fructose 1,6-biphosphatase ou la glucose 6 phosphatase, ont en effet une activité élevée dans la zone 1 (Jungermann & Kietzmann, 2000; Kietzmann et al., 2006). À l'inverse, les enzymes impliquées dans la glycolyse comme la glucokinase ou la *liver-type pyruvate kinase* sont plus exprimées dans la zone centro-lobulaire que dans les autres zones. En somme, la synthèse du glucose par gluconéogenèse prend place dans la zone du lobule dans laquelle l'oxygénation est la plus élevée ; l'utilisation du glucose par glycolyse est, quant à elle, favorisée dans la zone lobulaire la moins oxygénée. Cette disparité existe aussi pour les différentes isoformes des cytochromes (CYP) (Oinonen & Lindros, 1998).

Ces observations indiquent que les cellules s'adaptent à des taux variables en oxygène disponible pour leurs diverses fonctions métaboliques. Des acteurs moléculaires sont ainsi ciblés afin d'assurer cette adaptation.

2.2 Les facteurs centraux du métabolisme de l'hypoxie : les *hypoxia inducible factors* (HIFs)

2.2.1 Structure et fonctions des HIFs

2.2.1.1 Structure des HIFs

Les facteurs inductibles par l'hypoxie ou *hypoxia inducible factors* (HIFs) sont une famille de facteurs de transcription, régulateurs clés de l'adaptation cellulaire à l'hypoxie (Majmundar et al., 2010). Ces facteurs de transcription sont hétérodimériques et sont ainsi composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β. Trois sous-unités α différentes ont été décrites à ce jour (HIF-1α, HIF-2α et HIF-3α) et deux sous-unité β, HIF-1β ou *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 1* (ARNT) (Semenza, 2014), et ARNT2 moins connue et exprimée exclusivement dans le cerveau et le rein (Keith et al., 2001; Webb et al., 2013). Les 4 sous-unités (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α et HIF-1β) présentent des similarités de structure, plusieurs domaines étant effectivement conservés (**Figure 18**). C'est notamment le cas du domaine de liaison à l'ADN ou *basic helix-loop-helix* (bHLH) situé en N-terminal des protéines HIFs. Les HIFs contiennent également deux domaines répétés Per-Arnt-Sim (PAS A et PAS-B), impliqués dans la dimérisation des différentes sous-unités les unes avec les autres, qui interagissent *via* leurs domaines PAS (Martin et al., 2017). Ces deux domaines, bHLH et PAS sont hautement conservés au sein de la famille des HIFs, les domaines PAS de HIF-1α et HIF-2α ont en effet 70% d'homologie et leur domaine bHLH environ 85%. À l'inverse, les domaines bHLH et PAS de la sous-unité 3α ne partagent que

74% et environ 55% d'homologie avec les sous-unités HIF-1α et HIF-2α, respectivement (Dengler et al., 2014), laissant présager des fonctions biologiques divergentes entre HIF-1α/HIF-2α et HIF-3α.

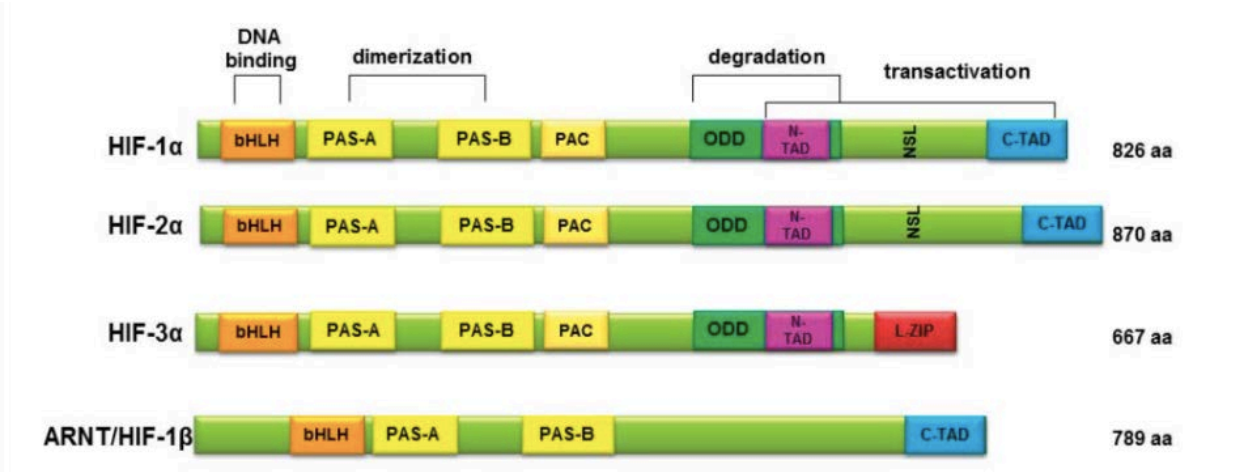


Figure 18. Structure linéaire des *hypoxia inducible factors.* *Toutes les sous unités contiennent un domaine basic helix-loop-helix (bHLH) et deux domaines Per ARNT-Sim (PAS-A et PAS-B) impliqués dans la liaison à l'ADN et la dimérisation, respectivement. Les 3 sous unités α sont également constituées d'un domaine PAS-associated C-terminal (PAC), participant à l'activité des domaines PAS d'un domaine oxygen-dependent degradation domain (ODD) ainsi que d'un domaine transactivation N-terminal domain (N-TAD) impliqués dans la dégradation des sous-unités et dans l'activité transcriptionnelle des sous unités α, respectivement. HIF-1α et HIF-2α ont également un domaine nuclear localization signal (NLS). Toutes les sous unités, à l'exception de HIF-3α sont également constituées d'un C-teminal domain (C-TAD), impliqué dans la régulation de la transcription des gènes cibles. La partie C-terminale de HIF-3α est, elle composé d'un domaine Leucin-Zipper domain (L-ZIP). Le nombre d'acides aminés constituant ces séquences est présenté à droite. D'après Martins et al., 2017.*

Les 3 sous-unités α sont également composées d'un domaine situé en C-terminal du domaine PAS, le *PAS-associated COOH-terminal domain* (PAC) qui participe à l'activité des domaines PAS et d'un domaine *N-transactivation domain* (N-TAD), nécessaire à l'activation des gènes cibles des HIFs. Le domaine *oxygen-dependent degradation domain* (ODD) est également présent chez les 3 sous-unités α, il est impliqué dans la régulation de la dégradation de ces sous-unités (voir section 2.2.2.1). Si l'organisation de la région N-terminale des 3 sous-unités α est similaire, celle de la région C-terminale diffère. Une séquence de localisation nucléaire ou *nuclear*

localization signal (NLS) ainsi qu'un domaine de transactivation supplémentaire situé en C-terminale, le *C-terminal transactivation domain* (C-TAD) sont ainsi présents dans la séquence de HIF-1α et de HIF-2α mais absents de celle de HIF-3α. Le domaine C-TAD participe à la régulation de l'expression des gènes cibles en se liant aux co-activateurs p300/CREB-binding protein (CBP) ou SRC-1 (Carrero et al., 2000; Ema et al., 1999). La région C-terminale de HIF-3α est, quant à elle, composée d'un unique *leucine zipper domain* (LZIP) avec 4 leucines et un motif d'interaction protéine – protéine LXXLL. L'organisation de la région C-terminale de HIF-1β est plus simple que celle des HIFs-α puisqu'en C-terminale du domaine PAS-B se trouve uniquement un domaine C-TAD (Martin et al., 2017).

2.2.1.2 Fonctions des HIFs

Les HIFs régulent divers gènes impliqués dans un grand nombre de voies cellulaires telles que la croissance cellulaire, l'angiogenèse, l'apoptose, le métabolisme du glucose, la réponse immunitaire ou le métabolisme lipidique (Schödel et al., 2011). Le rôle précis de chacune des 3 sous-unités α est toujours controversé et semble dépendant du type cellulaire considéré. Néanmoins, HIF-1α, qui est exprimé dans toutes les cellules de mammifères, favorise la transcription de toutes les enzymes de la glycolyse anaérobie (Benita et al., 2009; Semenza, 2012), permettant ainsi aux cellules d'adapter leur métabolisme énergétique (de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse anaérobie) dans des conditions de faibles concentrations en oxygène (voir section 2.2.3). L'expression de la sous-unité HIF-2α est, quant à elle, restreinte aux cellules endothéliales vasculaires, aux pneumocytes, aux cellules rénales interstitielles, aux cellules hépatiques ainsi qu'aux cellules du lignage myéloïde (Majmundar et al., 2010). HIF-2α, qui semble activer la transcription de moins de

gènes que HIF-1α est décrit comme un régulateur du métabolisme des lipides (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Rankin et al., 2009) et de l'érythropoïétine hépatique (Rankin et al., 2007). La sous-unité HIF-3α est beaucoup moins caractérisée que les deux autres. Elle est en effet plus difficile à étudier du fait notamment de l'existence d'une dizaine de transcrits différents du gène *HIF-3α* et d'outils moléculaires moins répandus que pour HIF-1α et HIF-2α (Duan, 2016). La sous-unité HIF-3α est exprimée dans le muscle squelettique, le cerveau, les poumons, le foie, les reins et le pancréas avec des taux d'expression variable dans ces tissus selon l'abondance des transcrits (Pasanen et al., 2010). Les fonctions de HIF-3α sont encore très peu connues et semblent varier selon les différents transcrits (Yang et al., 2015). Une étude a toutefois montré que HIF-3α était un facteur régulateur négatif de HIF-1α et HIF-2α en entrant en compétition avec ces deux sous-unités pour la liaison à HIF-1β (Hara et al., 2001).

2.2.2 Régulation des HIFs

2.2.2.1 Régulation dépendante de l'oxygène

Si l'expression de la sous-unité HIF-1β est constitutive dans le noyau, la stabilisation des sous-unités α est régulée (**Figure 19**).Notons ainsi que la régulation des taux de sous-unités α disponibles dans la cellule est principalement post-traductionnelle et fonction de la teneur intracellulaire en oxygène. Lorsque cette concentration est élevée, par exemple en condition d'oxygénation atmosphérique (21% O_2 – Normoxie), les sous-unités α sont traduites dans le cytoplasme depuis les ARNm mais rapidement hydroxylées sur deux résidus prolines du domaine ODD par les enzymes de la famille

des prolyl-hydroxylases (PHD) qui utilisent l'oxygène, les ions Fe^{2+} et le 2-oxoglutarate comme co-facteurs (Kaelin & Ratcliffe, 2008).

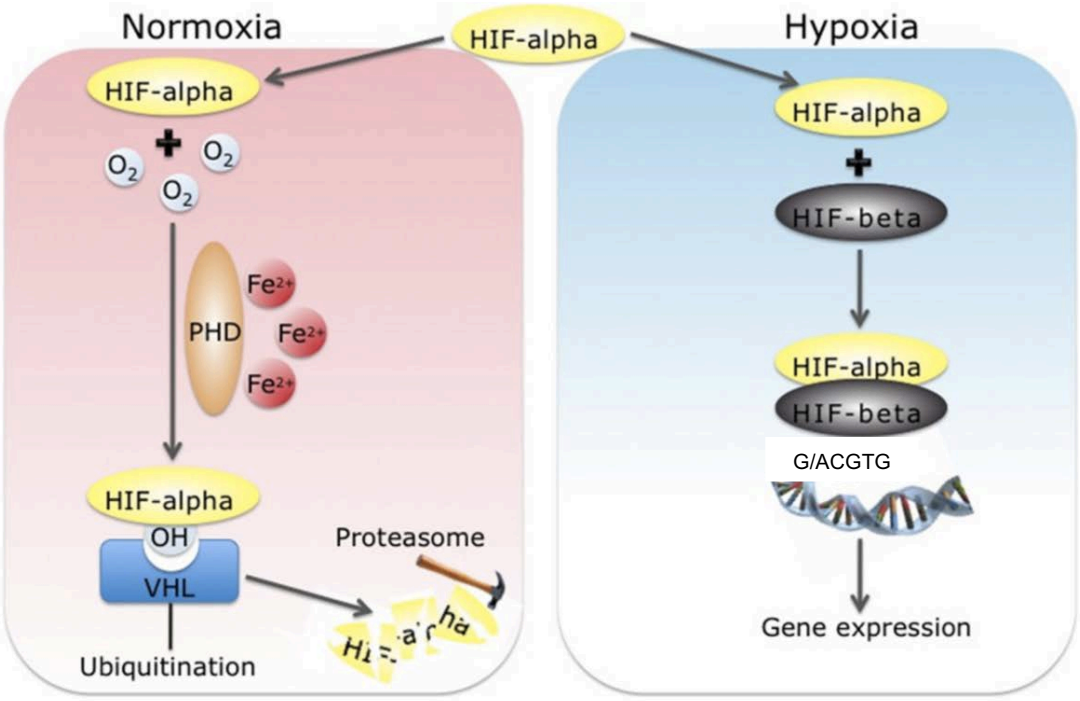


Figure 19. Régulation post-traductionnelle des HIF-α dépendante de l'oxygène. *En normoxie, les sous-unités α sont rapidement hydroxylées sur des résidus prolines (P402 et P564) par des enzymes de la famille des prolylhydroxylases (PHD) en présence d'ions Fe^{2+}. La protéine von Hippel Lindau (VHL) reconnaît alors ces formes hydroxylées et les ubiquitinyle, ce qui les conduit dans la voie de dégradation par le protéasome. En hypoxie, l'activité des PHD est inhibée, les sous-unités α se stabilisent et sont importées dans le noyau, où elles se dimérisent avec HIF-β. Le complexe HIF-α/HIF-β active alors la transcription des gènes cibles en se liant aux séquences hypoxia responsive element (HRE – G/ACGTG), situées dans le promoteur des gènes cibles. D'après Petousi et Robbins. 2013.*

Les résidus P402/P564, P405/P531 et P492 ont été identifiés comme cibles de ces hydroxylations pour les 3 sous-unités HIF-1α, HIF-2α et HIF-3α, respectivement. Ces hydroxylations permettent à la protéine von Hippel Lindau (VHL), une E3 ubiquitine ligase, de se lier aux sous-unités α et de les polyubiquitinyler, ce qui les conduit dans la voie de dégradation par le protéasome (Cockman et al., 2000). La demi-vie des sous-unités α en normoxie est donc très courte, d'environ 5 min. Lorsque la concentration en oxygène est faible (hypoxie), les PHD sont inactives, puisque

l'oxygène est un de ses co-facteurs. Les sous-unités α sont alors stabilisées dans le cytoplasme puis sont importées dans le noyau où elles se dimérisent avec la sous-unité β grâce aux domaines PAS de chacune d'elles. L'interaction de cet hétérodimère avec les cofacteurs p300/CBP ou SRC-1 permet de former le facteur de transcription entier (Ema et al., 1999). Celui-ci se fixe alors sur les séquences consensus G/ACGTG, les éléments de réponse à l'hypoxie ou *hypoxia response elements* (HRE) présentes dans les promoteurs des gènes inductibles par l'hypoxie, ce qui conduit à l'activation de la transcription de ces gènes cibles.

2.2.2.2 Régulation indépendante de l'oxygène

Bien que la régulation des HIFs dépendante de l'oxygène soit la plus importante, plusieurs voies de modulation des taux intracellulaires des sous-unités HIF-1α et HIF-2α indépendantes de l'oxygène ont été décrites. Ainsi, le *factor inhibiting HIF* (FIH), dont la constante de Michaelis (Km - affinité d'une enzyme pour son substrat) pour l'oxygène est très faible, peut hydroxyler les résidus asparagine 803 et 847 du domaine C-TAD de HIF-1α et HIF-2α, respectivement (Dengler et al., 2014). Cette hydroxylation, indépendante de la quantité d'oxygène disponible, perturbe l'interaction du domaine C-TAD avec le co-activateur CBP/p300 (Mahon et al., 2001). Certaines modifications post-traductionnelles peuvent également moduler l'expression des HIFs. C'est notamment le cas de la phosphorylation qui, en fonction du résidu concerné, a une action opposée sur la stabilisation des HIFs-α. La phosphorylation de HIF-1α et HIF-2α dans le domaine C-TAD favorise ainsi la stabilisation de ces facteurs (Richard et al., 1999), alors que la phosphorylation du domaine PAS-B de HIF-1α, inhibe son association avec HIF-1β et ainsi l'expression de ses gènes cibles (Kalousi et al., 2010).

La voie *mitogen-activated protein kinase* (MAPKinase) ainsi que le *mammalian target of rapamycine* (mTor), activée par la voie *phosphatidyl-inositol 3 Kinase / AKT* (PI3K/AKT) favorisent la transcription et la stabilisation de HIF-1α (Alam et al., 2009; Mylonis et al., 2006; Richard et al., 1999). Enfin, la *heat shock protein 90* (HSP90) et le *receptor of activated protein C kinase 1* (RACK1) sont en compétition pour la liaison au domaine PAS-A de HIF-1α (**Figure 20**). Si HSP90 se fixe sur ce domaine, HIF-1α est stabilisé. A l'inverse, si RACK1 s'y fixe, elle (RACK1) s'associe à l'élongine C, entrainant alors le recrutement de l'élongine B et d'autres composants de la E3 Ubiquitine ligase. Cette dernière ajoute des groupements d'ubiquitine sur la sous-unité

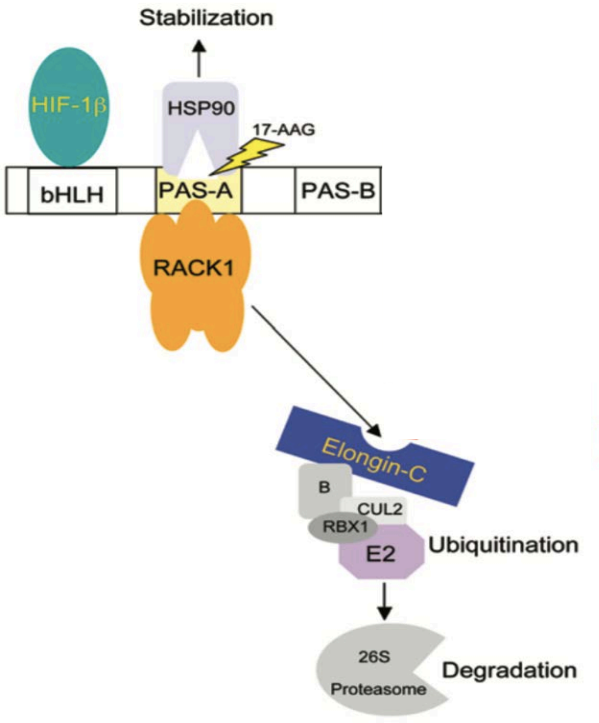


Figure 20. Exemple de régulation des HIFs α indépendante de l'oxygène : la balance RACK1 / HSP90. *Indépendamment de la quantité intracellulaire en oxygène disponible, les protéines heat shock protein 90 (HSP90) et receptor of activated protein C kinase 1 (RACK1) sont en compétition pour la fixation sur le domaine PAS-A de la sous-unité HIF-1α. Si la protéine HSP90 se fixe sur ce domaine, HIF-1α est stabilisé. Cet effet peut être contré par la 17-allylaminogeldanamycine (17-AAG). Si, au contraire, la protéine RACK1 se fixe sur le domaine PAS. RACK1 se lie alors à l'élongine C qui recrute l'élongineB et les autres composants de la E3 ubiquitine ligase au niveau de HIF-1α. Celle-ci est alors ubiquitinylée et dégradée par la voie du protéasome. D'après Liu et Semenza. 2007.*

HIF-1α qui est alors dégradée par le protéasome, de manière indépendante des PHD et de la VHL (Liu & Semenza, 2007; Schödel et al., 2011).

2.2.3 HIFs et métabolisme énergétique

Les cellules soumises à une faible concentration en oxygène induisent une reprogrammation massive de leur métabolisme énergétique, relevant de la nécessité d'adapter rapidement leur mode de production d'énergie à cette faible accessibilité à l'oxygène. Lorsque l'oxygène est abondant, la production d'énergie est assurée par la phosphorylation oxydative mitochondriale, permettant de métaboliser le glucose en pyruvate par glycolyse qui est alors oxydé dans la mitochondrie pour générer de l'adénosine tri-phosphate (ATP) (Papa. 1996). Lorsque la concentration en oxygène est faible, la production d'énergie est assurée par la glycolyse anaérobie où le pyruvate est alors quasi-totalement redirigé vers la production de lactate par la *lactate dehydrogenase A* (LDHA) (Brooks, 2018). Cette bascule entre ces deux modes de production d'énergie est régulée par HIF-1α qui active la transcription de toutes les enzymes de la glycolyse anaérobie telles que la *LDHA*, les *Glucose transporter 1 et 3* (GLUT-1 et GLUT-3), les *hexokinases 1 et 2* (HK1 et HK2) et la *phosphoglucokinase 1* (PGK1) (Gwak et al., 2005; Okabayashi, 1992; Semenza et al., 1996). Les cellules continuent ainsi, indépendamment de l'oxygène intracellulaire disponible, à produire l'énergie indispensable à leur survie et leurs fonctions.

2.2.4 HIFs et métabolisme lipidique

L'hypoxie et les HIFs sont des modulateurs de l'homéostasie des lipides dans divers tissus. Parmi les acteurs du métabolisme des lipides, la biogenèse des GLs est particulièrement impactée par les HIFs-α. HIF-1α favorise ainsi l'accumulation de triglycérides dans les GLs en augmentant l'expression de deux protéines de surface des GLs : la *hypoxia-inducible gene 2* (HIG-2) et la lipine-1 (DiStefano et al., 2015; Gimm et al., 2010; Mylonis et al., 2012). HIF-2α a été identifié comme un facteur inhibant la β-oxydation des acides gras, conduisant également au stockage des lipides neutres dans les GLs (Rankin et al., 2009). De plus, HIF-2α induit l'expression de l'ADRP, une protéine de surface des GLs déjà mentionnée (section 1.6.2.1), dans les lignées cellulaires dérivées d'hépatocarcinomes humains. Cette induction aboutit à l'augmentation de la taille et du nombre de GLs intracellulaires (Rankin et al., 2009). Par ailleurs Ujino et collaborateurs ont montré que les lignées hépatiques Huh7.5 et HepG2 cultivées en hypoxie exprimaient fortement le récepteur des VLDLs (VLDL-R). Les auteurs ont par ailleurs montré que cette surexpression était dépendante de HIF-1α et menait à une augmentation de l'import intracellulaire de LDL et de VLDL (Ujino et al., 2016).

2.3 Hypoxie, VHC et *Flaviviridae*

Les virus de la famille des *Flaviviridae* sont enveloppés à ARN simple brin de polarité positive, répartis en 4 genres : les Flavivirus, dont la plupart sont des *arthropod-borne viruses* (arbovirus), transmis par les moustiques ou les tiques. Parmi les Flavivirus, le ZIKV, le DENV, le WNV, le *Yellow fever virus* (YFV), le *Japanese encephalitis virus* (JEV) et le *Tick-born encephalitis virus* (TBEV) sont pathogènes pour l'Homme. Le

VHC est le seul représentant du genre *Hepacivirus* dans la famille des *Flaviviridae*. Les deux autres genres, les *Pestivirus* et les *Pegivirus* sont responsables d'infections chez les mammifères sauvages ou d'élevages (Simmonds et al., 2017). Les virus de la famille des *Flaviviridae* pathogènes pour l'Homme ont un tropisme hépatique primaire ou secondaire, et évoluent donc physiologiquement dans un environnement naturellement hypoxique (Begum et al., 2019; Gamino & Höfle, 2013; MacNamara, 1954; Manns et al., 2017; Mrzljak et al., 2019; Quaresma et al., 2006; Ricklin et al., 2016). L'impact d'une faible concentration en oxygène sur le pouvoir infectieux de ces virus a été, à ce jour, uniquement décrite pour le VHC et le DENV. Ainsi, Vassilaki et collaborateurs ont montré qu'une exposition courte (48 heures) des cellules Huh7.5, à une faible concentration en oxygène augmentait significativement la réplication du VHC. En modulant la production d'ATP dans ces cellules *via* une exposition à des concentrations fortes ou faibles en glucose, en galactose ou en glutamine, les auteurs ont montré que cette augmentation de la réplication virale est proportionnelle à la production d'ATP par glycolyse anaérobie (Vassilaki et al., 2013). Ces observations ont été confirmées et complétées par Ujino et collaborateurs quelques années plus tard qui ont mis en évidence que l'hypoxie favorisait l'entrée du VHC dans les cellules Huh7.5 ainsi que dans les PHH. Cette meilleure entrée virale a été décrite comme dépendante du récepteur des VLDL, dont l'expression est augmentée en hypoxie (Ujino et al., 2016). Cette étude a ainsi mis en lumière qu'en condition de faible concentration en oxygène, le VHC entre dans les cellules hépatiques *via* le VLDL-R et de manière dépendante de la glycoprotéine d'enveloppe E2 et de l'ApoE à la surface de la particule virale. Cependant, de manière surprenante, cette entrée virale ne nécessite pas les facteurs d'entrée cellulaire jusqu'ici décrient comme indispensables (CD81, SR-B1 ; Occludine), indiquant que le repositionnement des cellules dans un

environnement naturellement pauvre en oxygène reconfigure les mécanismes d'entrée virale jusqu'alors décrits (Ujino et al., 2016).

L'impact de la faible concentration physiologique en oxygène sur les premières étapes du cycle du VHC, comme sur sa réplication génomique a donc donné lieu à des travaux. En revanche, aucune donnée n'est disponible sur les étapes tardives du cycle viral, qui pourtant sont dépendantes de facteurs cellulaires très fortement impactés par la faible oxygénation, donc l'activation des HIFs-α (métabolisme des lipides).

Par ailleurs, si la culture de cellules hépatiques dans ces conditions semble représenter un environnement favorable à l'infection par le VHC, il a été montré que le virus lui-même était capable d'induire l'expression du facteur HIF-1α. Il semble ainsi que la protéine core du VHC induise des dysfonctionnements mitochondriaux à l'origine d'une production accrue de *reactive oxygen species* (ROS) qui stabilisent HIF-1α. Ces données renforcent les notions d'interactions importantes entre les HIFs et le VHC pour la reprogrammation des voies métaboliques cellulaires (Abe et al., 2012; Ripoli et al., 2010).

De manière similaire, l'infection du DENV est favorisée lorsque les cellules hépatiques sont soumises à une faible concentration en oxygène (Frakolaki et al., 2018). Dans ces conditions de culture, la réplication ainsi que l'infectiosité des particules virales sont augmentées. L'extinction ciblée de l'expression des deux sous-unités HIF-1α et HIF-2α a suggéré que HIF-1α était responsable de ces caractéristiques virales. Enfin, si à l'inverse du VHC, l'infection de lignées d'hépatocytes par le virus DENV n'est pas décrite comme stabilisatrice des protéines HIFα en normoxie, il semble néanmoins que les quantités d'ARNm de leurs cibles soient augmentées (Frakolaki et al., 2018).

De plus, de manière intéressante, les lésions hépatiques consécutives à une infection par le YFV sont observées préférentiellement dans la zone 2 (zone médiane) du lobule

hépatique, soumise à une faible oxygénation (Quaresma et al., 2006) (voir section 2.1). Il est envisageable que ces lésions soient dues à une réplication massive du YFV dans cette zone dont la faible oxygénation naturelle pourrait représenter un environnement favorable.

Ainsi, à la fois pour leur cycle intracellulaire mais aussi pour les conséquences cellulaires de leur infection, les virus de la famille des *Flaviviridae* semblent sensibles aux conditions naturelles de faible oxygénation. Des analyses complémentaires sont néanmoins nécessaires pour comprendre plus finement ces liens dans des modèles d'études encore plus appropriés.

III. Objectifs généraux

3.1 Objectifs de l'étude 1

L'hypothèse générale de travail pour ce projet était que la combinaison de la différenciation cellulaire et de l'hypoxie prolongée permettrait de rapprocher métaboliquement les cellules de la lignée cellulaire Huh7.5 d'hépatocytes natifs. Ces cultures ainsi infectées par le VHC permettraient ainsi une production de LVPs biochimiquement et ultra structurellement proches de particules isolées de patients. À la lumière de cette hypothèse, plusieurs objectifs se sont dessinés :

1) Mettre au point et caractériser l'état de différenciation et d'adaptation à l'hypoxie d'un modèle de cellules Huh7.5 partiellement différenciés par le DMSO et cultivées en hypoxie physiologique et prolongée ;
2) Caractériser plusieurs acteurs lipidiques d'importance pour le cycle du VHC

3) Déterminer les caractéristiques biochimiques et structurales des particules du VHC produites par ce modèle.

3.2 Objectifs de l'étude 2

Dans un second temps, l'objectif était d'élargir l'utilisation du modèle cellulaire expérimental à d'autres virus de la famille des *Flaviviridae*. En raison des similarités de son cycle viral intracellulaire avec celui du VHC, le DENV a été choisi pour évaluer ses caractéristiques virologiques en cellules partiellement différenciées et cultivées en hypoxie.

3.3 Objectifs de l'étude 3

L'impact de l'hypoxie physiologique sur l'infection *in vitro* par le ZIKV n'a jusqu'à aujourd'hui jamais été rapporté. L'objectif premier de ce projet était donc de déterminer cet impact sur la culture du ZIKV. Le second objectif était d'étudier les conséquences cellulaires de l'infection dans ces conditions et de mettre en évidence les mécanismes moléculaires sous-jacents.

ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

I. Étude du VHC dans un modèle *in vitro* combinant différenciation cellulaire et hypoxie naturelle prolongée

Les travaux consécutifs à ce projet ont fait l'objet d'une publication dans la revue internationale à comité de lecture *Hepatology* :

Cochard J, Bull-Maurer A, Tauber C, Burlaud-Gaillard J, Mazurier F, Meunier J, *et al*. Differentiated Cells in Prolonged Hypoxia Produce Highly Infectious Native-Like Hepatitis C Virus Particles. Hepatology. 2021; 74; 627-640. hep.31788. https://doi.org/10.1002/hep.31788. PMID: 33665810.

Cet article vous est présenté dans son intégralité de la page 82 à la page 104 du manuscrit. À noter que dans la section 1.4, les "Figure X" se réfèrent aux figures de l'article en question et non pas à celles du manuscrit.

1.1 Situation du sujet avant la thèse

Le VHC isolé de sera infectés possède une morphologie, une taille et des propriétés physicochimiques inhabituellement hétérogène pour un virus enveloppé (Andre et al., 2002; Piver et al., 2017). Ces caractéristiques varient considérablement d'avec celles de virus cultivés *in vitro* en lignées cellulaires dérivées d'hépatocarcinomes humains. Le diamètre des particules virales natives notamment, bien qu'hétérogène, est significativement supérieur à celui des virions des VHCcc (Piver et al., 2017). Ces variations sont surtout liées à la présence importante sur les particules virales natives, d'un manteau lipidique d'origine cellulaire. Cette particularité confère aux virions natifs du VHC, en plus d'une taille importante (130 à 200 nm de diamètre), une faible densité

comparée aux VHCcc (1,00 à 1,10 g/mL) (Bradley et al., 1991). Il a par ailleurs été montré, lors d'expériences d'infection *in vivo*, que l'inoculum le plus infectieux était celui de plus faible densité, attestant de la relation entre lipidation de la particule virale et pouvoir infectieux (Bradley et al., 1991). Une limite importante à la caractérisation du VHC mais également au développement d'un vaccin prophylactique est la faible efficacité d'infection *in vitro* de ces particules virales issues de patients. Pour pallier cette limite, plusieurs modèles expérimentaux cellulaires sont utilisés dont celui des particules du VHCcc produites par les cellules Huh7.5 (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005). Alors que ces VHCcc ont un profil hétérogène en densité (1,00 à 1,117 g/mL), leur infectiosité spécifique dans les fractions de faible densité est modeste, reflétant une lipidation incomplète, ce qui a été confirmé au laboratoire par observation au MET (Bradley et al., 1991; Piver et al., 2017; Podevin et al., 2010). Cette variation de lipidation a été attribuée à un métabolisme lipidique défectueux en cellules Huh7.5, limitant la formation de VLDL totalement lipidées. Il apparaît donc que les modèles conventionnels, présentent des limites pour la production de particules natives du VHC ainsi que pour l'étude des interactions virus/lipides. L'utilisation de PHH permet de pallier ces limites puisqu'ils sont infectables par les virus natifs du VHC (Gondeau et al., 2014). Leur utilisation est néanmoins limitée du fait de leur difficulté d'obtention et de culture, de la forte variabilité inter-donneurs et surtout de leur faible permissivité. Ainsi, diverses améliorations des modèles cellulaires conventionnels ont été proposées. Certains travaux ont ainsi permis d'améliorer la re-différenciation de lignées dérivées d'hépatocarcinomes en un phénotype pseudo-hepatocytaire, par ajout de DMSO dans le milieu de culture ou par exposition à du sérum humain (Bauhofer et al., 2012; Sainz & Chisari, 2006; Steenbergen et al., 2013). Ces cultures présentent alors des caractéristiques d'hépatocytes différenciés, tant dans

l'expression de divers marqueurs de différenciation hépatocytaire que dans leur croissance cellulaire, quasiment inexistante. Par des mécanismes qui n'ont pas été explorés, ces cultures permettent d'améliorer significativement l'infection *in vitro* du VHCcc (Sainz et Chisari., 2010 // Bauhofer et al., 2012). Steenbergen et collaborateurs ont montré que la différenciation partielle de la lignée Huh7.5, par exposition prolongée à du sérum humain, rétablissait la sécrétion de VLDL fortement lipidées et permettait d'augmenter par plus de 1000 fois le titre infectieux des particules virales produites, comparé aux mêmes cellules cultivées avec du SVF (Steenbergen et al., 2013). Ces informations laissent à penser que les modèles de lignée hépatocytaire partiellement différenciées (par ajout de DMSO ou de sérum humain dans le milieu de culture) présentent un environnement intracellulaire favorable au cycle viral complet du VHC.

Par ailleurs, l'infection par le VHCcc de lignées hépatiques cultivées dans des conditions d'hypoxie de courte durée (48 et 72 heures) a déjà donné lieu à deux publications (Ujino et al., 2016; Vassilaki et al., 2013). Dans un premier temps, Vassilaki et collaborateurs ont montré que la culture de cellules Huh7.5 sous une faible concentration en oxygène (3% O_2) augmentait significativement la réplication du VHC. De façon intéressante, les auteurs indiquent que les cellules doivent être exposées à une faible concentration en oxygène en amont de l'infection, suggérant que des facteurs cellulaires sont induits par l'hypoxie pour potentialiser la réplication du VHC (Vassilaki et al., 2013). L'une des explications est que l'hypoxie favorise l'expression du récepteur des VLDL qui devient, dans ces conditions, le récepteur d'entrée préférentiel du virus (Ujino et al., 2016). Afin d'être plus proche des conditions naturelles d'infection, Vassilaki et collaborateurs (Vassilaki et al., 2013) indiquent qu'ils ont en outre conjointement exposé une culture de cellules Huh7.5 à 1% (vol/vol) de DMSO et à une hypoxie durant 72 heures, qui montre sa permissivité à l'infection par

le VHC et qu'elle supporte une infection de longue durée (2 semaines). Ces résultats indiquent que la combinaison de la différenciation cellulaire et de l'hypoxie naturelle est favorable au cycle viral du VHC. En revanche, alors que ces deux caractéristiques produisent de profonds changements métaboliques (notamment lipidiques), aucune donnée n'est disponible sur ces modifications. Nous connaissons pourtant le rôle central joué par les lipides dans les étapes tardives de la production virale dont aucune donnée n'était jusqu'alors disponible dans ce modèle.

1.2 Objectifs

Nous avons postulé que la combinaison de la différenciation cellulaire et de l'hypoxie, deux caractéristiques très associées à la lipogenèse et présentes dans le foie normal, est essentielle au rétablissement du métabolisme lipidique adéquate en lignée cellulaire pour permettre une morphogenèse virale.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient :

1) De caractériser une culture de cellules Huh7.5 différenciées, exposées à une faible concentration en oxygène (hypoxie). Cette caractérisation imposait d'évaluer l'impact de l'hypoxie sur les facteurs de différenciation et réciproquement ;

2) d'évaluer les niveaux d'induction de certains acteurs du métabolisme lipidique, centraux dans les étapes tardives du cycle intracellulaire du VHC ;

3) D'établir une infection solide de la culture cellulaire et de déterminer les caractéristiques biochimiques, antigéniques et structurales des particules virales produites par ce modèle, au regard de celles produites par le modèle conventionnel d’étude du VHC.

1.3 Approches expérimentales

Dans cette section seront détaillées les approches expérimentales originales et/ou peu décrites dans la littérature. Une description complète de toutes les approches expérimentales est disponible dans la section « *Supplementary material and methods* » de l'article relatif à cette étude (Pages 96 à 104).

1.3.1 Cultures cellulaires

Nous avons choisi de partiellement différencier les cellules de la lignée Huh7.5 par ajout de 1% de DMSO dans le milieu de culture pendant 14 jours, comme déjà décrit, (Sainz & Chisari, 2006). La différenciation induite par exposition au sérum humain n'a pas été retenue, en raison de la forte variabilité inter-donneurs, des variations d'approvisionnement et de qualification des échantillons. Le DMSO est ajouté au milieu de culture au stade 90% de confluence. Les 5 derniers jours de culture, (J9 après exposition au DMSO), les cellules ont été cultivées en hypoxie (1% O_2, 5% CO_2, 94% N_2 ; vol/vol) dans une station à hypoxie, permettant de contrôler la concentration en oxygène, en CO_2, la température et l'hygrométrie (**Figure 21**). Le pourcentage d'oxygène choisi ici est celui le plus fréquemment utilisé dans la littérature et reflète l'oxygénation intracellulaire (Carreau et al., 2011). Nous avons également choisi une hypoxie prolongée par rapport aux autres études du VHC en hypoxie (Ujino et al., 2016; Vassilaki et al., 2013). En effet, si la sous-unité HIF-1α est décrite comme étant rapidement stabilisée lorsque la concentration en oxygène descend en dessous de 5%, nous n'avons pas observé de stabilisation nucléaire de la sous-unité HIF-2α avant

96 heures d'hypoxie (voir section « *Supplementary material and methods* » de l'article relatif à ce chapitre). Des travaux préalables à mon arrivée au laboratoire tendent également à montrer qu'avant 5 jours d'hypoxie, l'expression des gènes cibles de HIF-1α et HIF-2α n'est pas stabilisée, reflétant certainement un stress cellulaire (données non montrées). Cette culture, combinant différenciation cellulaire et hypoxie prolongée sera nommée cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ dans la suite du manuscrit, par opposition au modèle de culture cellulaire standard d'étude du VHC, où les cellules sont non différenciées et cultivées en normoxie (cellules Huh7.5^{Std}). Deux autres cultures ont également été utilisées comme contrôles expérimentaux : les cellules différenciées et cultivées en normoxie pendant 14 jours (cellules Huh7.5^{Diff}) ; et les cellules non différenciées et cultivées en hypoxie pendant 5 jours (cellules Huh7.5^{Hypo}).

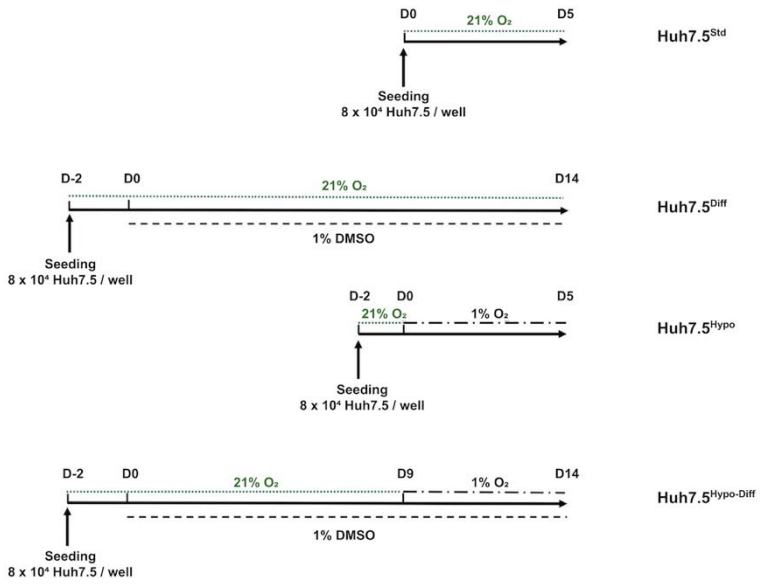


Figure 21. Représentation schématique du protocole expérimental d'obtention des cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$. *Les cellules Huh7.5^{Std} sont les cellules contrôles non différenciées, cultivées pendant 5 jours sous une concentration en oxygène atmosphérique (normoxie – 21% O_2). Les cellules Huh7.5^{Diff} sont cultivées pendant 14 jours en présence de 1% de DMSO en normoxie. Les cellules Huh7.5^{Hypo}, non différenciées, sont cultivées pendant 5 jours sous une faible concentration en oxygène (hypoxie – 1% O_2). Les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ sont cultivées pendant 9 jours en normoxie et en présence de 1% de DMSO puis 5 jours en hypoxie toujours en présence de 1% de DMSO.*

1.3.2 Immunocaptures et observation au microscope éléctronique à transmission

La visualisation au microscope électronique à transmission (MET) des lipoprotéines riches en ApoE et des particules virales sécrétées dans le surnageant des cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$, a été réalisée grâce à une technique développée au laboratoire : l'immunnocapture suivie d'une observation au MET (IC-MET) (Piver et al., 2017). Des grilles de microscopie recouvertes d'un film de carbone sont pré-incubées avec un anticorps spécifique de l'ApoE humaine ou des hétérodimères des glycoprotéines d'enveloppe du VHC, puis mises en contact avec le surnageant de culture non congelé. Après plusieurs lavages, les grilles sont contrastées avec de l'acétate d'uranyl et enfin observées au MET. Les images issues de ces observations, ont permis de quantifier la taille des lipoprotéines riches en ApoE ou des particules virales sécrétées par les différentes cultures.

1.4 Résultats principaux

L'analyse de divers marqueurs de la différenciation hépatocytaire (ARNm de l'*Albumine*, de *A1AT*, de *Cyp3A4* et présence de jonctions serrées cellule-cellule) mais aussi d'adaptation cellulaire à l'hypoxie physiologique (stabilisation de HIF-1α et HIF-2α et activation transcriptomique de leurs gènes cibles) a montré que les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ présentaient des caractéristiques cellulaires qui étaient plus proches d'hépatocytes *in situ* que les cultures de cellules témoins Huh7.5^{Std}, classiquement utilisées pour l'étude du VHC (**Figure 2 de l'article**).

De façon tout à fait intéressante, les cellules du modèle Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ activent significativement le stockage des lipides neutres sous forme de gouttelettes lipidiques (GLs) plus nombreuses et plus grosses (**Figures 3A, B et C de l'article**). Le stockage des composants lipidiques constitutifs des lipoprotéines semble ainsi être favorisé dans la situation combinant différenciation cellulaire et hypoxie. Puisque l'ApoE joue un rôle à la fois sur la production des lipoprotéines, leur maturation mais aussi à différentes étapes du cycle du VHC et notamment sa morphogenèse, nous avons évalué la synthèse de l'ApoE mais aussi la taille des lipoprotéines sécrétées riches en ApoE. Les résultats montrent que l'expression de l'ApoE est stimulée en cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ (RT-qPCR, **Figure 3D de l'article**), qui s'accompagne d'une production extracellulaire de lipoprotéines riches en ApoE de tailles significativement plus importantes qu'en condition standard de culture (**Figure 3E et F de l'article**). Le modèle de culture Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ activerait donc spécifiquement le métabolisme des lipoprotéines, une donnée qui pourrait être en faveur d'une morphogenèse virale améliorée dans le cadre d'une infection de ce modèle par le VHC.

Ces cellules ont donc été infectées par le clone JFH1 du VHC (MOI 0,01). Les quantités d'ARN viral intra- et extracellulaires mesurées 48 heures post-infection n'ont pas montré de différences significatives entre cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ et Huh7.5^{Std} suggérant un niveau de réplication virale comparable entre ces deux cultures (**Figures 4A et B de l'article**). En revanche, les particules virales produites par les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ infectées dans ces conditions présentaient un pouvoir infectieux 6 fois supérieur à celles produites par les cellules Huh7.5^{Std} mais aussi comparé aux autres cultures témoins (Huh7.5^{Diff} et Huh7.5^{Hypo})(**Figure 4C de l'article**). L'ensemble de ces résultats d'infection nous indiquaient clairement qu'à capacités réplicatives égales du VHC avec les autres cultures cellulaires, les cellules Huh7.5 partiellement

différenciées et cultivées sous une atmosphère en O_2 proche des conditions physiologiques produisaient des particules du VHC au pouvoir infectieux très significativement supérieur. Ces résultats suggèrent que des adaptations structurales avantageuses des LVPs s'opèrent spécifiquement dans ces cellules ; adaptations absentes dans les autres cultures.

En accord avec cette hypothèse, la majorité des virions infectieux produits par la culture Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ avaient une très faible densité (<1,03 g/mL) alors que la majorité de ceux produits par la culture Huh7.5^{Std} avaient une densité moyenne (entre 1,03 et 1,08 g/mL) (**Figures 5A et B de l'article**). De même, la neutralisation de l'infection des particules néo-produites en cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ par des anticorps neutralisants, ciblant E2 (AR3A) ou le complexe E1E2 (AR4A et AR5A), était très nettement plus efficace que pour celles issues des cellules Huh7.5^{Std} (**Figure 5C de l'article**). L'ensemble de ces données suggéraient ainsi que les LVPs produites en cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ présentaient des caractéristiques structurales plus proches de LVPs natives que celles produites en conditions standards de culture.

Les particules virales ont alors été observées par une approche IC-TEM utilisant l'anticorps conformationnel AR5A ciblant l'hétérodimère des glycoprotéines d'enveloppe E1E2. Cette approche a permis de mettre en évidence que les cellules partiellement différenciées et exposées à une hypoxie prolongée, produisaient des LVPs qui présentaient une ultrastructure proche de particules natives, isolées d'un sérum de patient. Ces LVPs possédaient en effet une nucléocapside sans symétrie définie, positionnée de manière asymétrique dans un épais manteau lipidique (**Figures 6A à D de l'article**), élargissant significativement la taille de ces LVPs (**Figure 6E de l'article)**. Ces données observationnelles sont particulièrement intéressantes car elles viennent en appui des mesures de densités des LVPs produites par ces cellules et

confirment que le modèle de culture expérimental permet de respecter plus fidèlement le cycle viral complet du VHC, notamment pour ce qui est de ses étapes tardives.

1.5 Discussion

Aucun travail ne s'était employé à analyser l'impact de la combinaison de la différenciation cellulaire et de l'hypoxie physiologique sur les dernières étapes du cycle viral, qui pourtant empruntent des voies lipidiques stimulées à la fois par la différenciation cellulaire et par l'hypoxie naturelle.

Ce travail de thèse a permis de confirmer que les cellules Huh7.5^{Std} sécrètent des lipoprotéines de taille modeste, contenant de l'ApoE et probablement pauvres en lipides neutres contrairement aux lipoprotéines présentes dans le sérum humain (Piver et al., 2017). À l'inverse, les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ sécrètent des lipoprotéines de grande taille et riches en ApoE, une caractéristique non observée dans les surnageants des cellules Huh7.5^{Diff} ou Huh7.5^{Hypo}, suggérant que la restauration de la lipidation des lipoprotéines nécessite de combiner ces deux paramètres (différenciation cellulaire et hypoxie prolongée). Comparativement aux cellules Huh7.5^{Std}, le stockage des lipides neutres dans les GLs est également stimulé dans les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$. Il est intéressant de noter qu'un effet similaire, mais de moindre ampleur est également notable dans les Huh7.5^{Hypo}. Cette observation est cohérente avec le fait que les HIF-α activent la transcription de divers gènes impliqués dans le stockage des lipides neutres (DiStefano et al., 2015; Rankin et al., 2009). Plus précisément, la sous-unité HIF-2α pourrait être un candidat de choix pour expliquer cette stimulation du stockage lipidique comme déjà décrit pour les cellules Huh7 (Rankin et al., 2009).

Les virions produits par les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ infectées par le clone JFH1 du VHC (LVP$^{Hypo\text{-}Diff}$) présentent des différences majeures avec ceux produits par les cellules Huh7.5^{Std} (LVP^{Std}). Les LVP$^{Hypo\text{-}Diff}$ sont effectivement 6 fois plus infectieuses et présentent une densité significativement plus faible que les LVP^{Std}. Une explication possible à ce pouvoir infectieux renforcé pourrait être que les hétérodimères des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 adoptent une conformation mieux adaptée à l'entrée virale. Cette hypothèse s'appuie sur la meilleure capacité neutralisante de l'infection des LVP$^{Hypo\text{-}Diff}$ par des anticorps monoclonaux (AR3A, AR4A et AR5A) ciblant spécifiquement des épitopes sur les glycoprotéines d'enveloppe virale. Ces données, adossées aux caractéristiques structurales et de densités des LVP$^{Hypo\text{-}Diff}$, tendent à montrer qu'elles présentent des caractéristiques similaires à celles de LVP natives.

Il serait intéressant de déterminer si ces caractéristiques structurales des LVP$^{Hypo\text{-}Diff}$ sont acquises au cours de la morphogenèse intracellulaire du VHC ou si elles sont acquises après la sécrétion de la particule virale dans le milieu extracellulaire, comme cela a récemment été suggéré (Denolly et al., 2019). Deux approches expérimentales complémentaires pourraient être envisagées : la première consisterait à comparer le pouvoir infectieux, la densité, le pouvoir neutralisant par les anticorps précédemment décrits et l'ultrastructure des LVP$^{Hypo\text{-}Diff}$ extraites des surnageants de culture et des compartiments intracellulaires après lyse osmotique ménagée ; la deuxième approche serait de tester le pouvoir infectieux de LVP^{Std} préalablement incubées avec le surnageant de cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ non infectées. Cette approche pourrait permettre de répondre à l'hypothèse d'un ou de facteur(s) soluble(s) sécrété(s) par ces cellules qui modifieraient favorablement, en post-production, l'ultrastructure des LVP^{Std}.

Malgré plusieurs essais, ce modèle ne nous a pas permis d'établir une infection détectable par des sera de patients infectés par le VHC. Comme pour d'autres

modèles cellulaires d'infection *in vitro*, cet échec peut trouver son explication dans la complexité des inocula, composés de multiples facteurs sériques non contrôlés, d'une quasi-espèce virale et de pools d'anticorps, certains neutralisants. Néanmoins, afin de s'assurer de la non spécificité des résultats vis-à-vis du clone JFH1 et du génotype 2a, il serait important de confirmer nos résultats avec l'emploi de clones viraux d'autres génotypes. Des infections par des virus dits chimériques, codant les protéines non structurales du clone JFH1 et les protéines structurales d'autres génotypes (souche H77/JFH1, génotype 1a et souche ED43/JFH1, génotype 3a), ont été envisagées. Cependant, pour des raisons encore inconnues, les inocula produits étaient insuffisamment infectieux pour réaliser ces expériences. De nouvelles productions virales sont à envisager.

Pour ce qui est de perspectives plus élargies, ce modèle cellulaire pourrait être envisagé comme un outil dans une stratégie vaccinale. En effet, compte tenu du profil d'expression de l'apoE et des lipoprotéines observées en cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$, mais aussi de la morphologie des LVPs produites, similaires aux LVPs natives, il sera pertinent de mesurer le pouvoir neutralisant de l'infection dans notre modèle par les anticorps induits par des particules vaccinales ayant ou non incorporées de l'apoE à leur surface. Ces outils vaccinaux sont actuellement en développement dans le laboratoire (Thèse Elsa Gomez, 2021). Les LVP$^{Hypo\text{-}Diff}$ pourraient ainsi servir d'outil de validation de l'efficacité de la réponse humorale neutralisante induite par une stratégie vaccinale.

Enfin, ce modèle de culture cellulaire offre probablement de nouvelles perspectives dans l'étude des cycles de vie et des dérégulations cellulaires associées à d'autres virus hépatotropes. Par exemple, d'autres virus de la famille des *Flaviviridae* comme le virus de la Dengue ou le virus West-Nile présentent un cycle viral pour lequel,

comme le VHC, les GLs et la biogenèse des VLDL semblent importantes (Faustino et al., 2014; Martins et al., 2019). Néanmoins, ce modèle pourrait aussi intéresser l'étude d'autres virus plus éloignés de cette famille virale. Ainsi, la description récente de la dépendance du cycle du VHB à l'ApoE (Qiao & Luo, 2019) souligne une fois de plus l'importance de la voie des lipoprotéines dans un schéma qui pourrait être général pour les virus hépatotropes.

1.6 Article publié

HEPATOLOGY

HEPATOLOGY, VOL. 74, NO. 2, 2021

Differentiated Cells in Prolonged Hypoxia Produce Highly Infectious Native-Like Hepatitis C Virus Particles

Jade Cochard,[1] Anne Bull-Maurer,[1] Clovis Tauber,[2] Julien Burlaud-Gaillard ,[3] Frédéric Mazurier,[4] Jean-Christophe Meunier,[1] Philippe Roingeard,[1,3] and Philippe Chouteau [1]

BACKGROUND AND AIMS: Standard hepatitis C virus (HCV) cell-culture models present an altered lipid metabolism and thus produce lipid-poor lipoviral particles (LVPs). These models are thereby weakly adapted to explore the complete natural viral life cycle.

APPROACH AND RESULTS: To overcome these limitations, we used an HCV cell-culture model based on both cellular differentiation and sustained hypoxia to better mimic the host-cell environment. The long-term exposure of Huh7.5 cells to DMSO and hypoxia (1% O_2) significantly enhanced the expression of major differentiation markers and the cellular hypoxia adaptive response by contrast with undifferentiated and normoxic (21% O_2) standard conditions. Because hepatocyte-like differentiation and hypoxia are key regulators of intracellular lipid metabolism, we characterized the distribution of lipid droplets (LDs) and demonstrated that experimental cells significantly accumulate larger and more numerous LDs relative to standard cell-culture conditions. An immunocapture (IC) and transmission electron microscopy (TEM) method showed that differentiated and hypoxic Huh7.5 cells produced lipoproteins significantly larger than those produced by standard Huh7.5 cell cultures. The experimental cell culture model is permissive to HCV–Japanese fulminant hepatitis (JFH1) infection and produces very-low-buoyant-density LVPs that are 6-fold more infectious than LVPs formed by standard JFH1-infected Huh7.5 cells. Finally, the IC–TEM approach and antibody-neutralization experiments revealed that LVPs were highly lipidated, had a global ultrastructure and a conformation of the envelope glycoprotein complex E1E2 close to that of the ones circulating in infected individuals.

CONCLUSIONS: This relevant HCV cell culture model thus mimics the complete native intracellular HCV life cycle and, by extension, can be proposed as a model of choice for studies of other hepatotropic viruses. (Hepatology 2021;74:627-640).

Hepatitis C treatment has been revolutionized by the recent introduction of highly effective direct-acting antivirals (DAAs) into therapeutic protocols that can cure most of the patients treated.[1] However, several major barriers to hepatitis C virus (HCV) eradication remain: the screening of subjects for treatment remains a difficult task, combination treatments including DAAs are not sufficiently prescribed in many countries, and emerging DAAs treatment failures have been reported.[2-4] Moreover, although a viral cure decreases the overall risk of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients, it does not eliminate this risk entirely, particularly in patients with advanced fibrosis.[3,5] Important challenges in

Abbreviations: ApoE, apolipoprotein E; DAA, direct-acting antivirals; DENV, dengue virus; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, cell culture–adapted model for HCV; HIF, hypoxia-inducible factor; Huh7.5^{Diff}, differentiated Huh7.5 cells cultured in normoxia; Huh7.5^{Hypo}, undifferentiated Huh7.5 cells cultured in hypoxia; Huh7.5$^{Hypo-Diff}$, differentiated Huh7.5 cells cultured in hypoxia; Huh7.5^{Std}, undifferentiated Huh7.5 cells cultured in normoxia; IC, immunocapture; JFH1, Japanese fulminant hepatitis; LD, lipid droplet; LVP, lipoviral particle; nAb, neutralizing antibody; TEM, transmission electron microscopy.

Received June 8, 2020; accepted February 5, 2021.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.31788/suppinfo.

Supported by the Centre Val de Loire Region (HypoVir Project 119974) and "La Ligue Nationale contre le Cancer" (Comités de l'Indre et Loire, du Loir et Cher et de l'Eure et Loir). J.C. received a Ph.D. grant from the Centre Val de Loire Region.

© 2021 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.31788

Potential conflict of interest: Nothing to report.

fundamental and clinical HCV research therefore remain to be addressed.

One of the major obstacles to HCV characterization is the low *in vitro* infection efficiency of viral particles from patients. The development of the long-awaited infectious cell culture–adapted model for HCV (HCVcc) in 2005 was, therefore, a major breakthrough in viral studies.[6,7] This system consists of the strict combination of a strain derived from HCV-2a–Japanese fulminant hepatitis (JFH1) that is highly adapted to cell cultures and highly permissive subclones of the human hepatoma–derived Huh7 cells. This model has yielded much insight into viral entry, translation, and RNA replication of the HCV life cycle. Nevertheless, viral assembly and morphogenesis, which have been reported to be closely linked to cellular lipid metabolism, remain poorly characterized. HCVcc virions display a number of major biochemical and ultrastructural differences with respect to the viral particles that circulate in the blood of HCV-infected patients.[8-10] Native HCV is actually unique in its ability to associate closely with lipoprotein components, forming hybrid particles known as lipoviral particles (LVPs).[11,12] By combining LVP immunocapture (IC) and transmission electron microscopy (TEM) approaches, our group has already shown that native LVPs are much larger than their HCVcc counterparts because of differences in the thickness of the lipid coat surrounding the virions.[13] Previous studies have shown that the infectivity of HCVcc particles is mostly associated with high density, whereas large, highly-lipidated, and low-density native LVPs are mostly infectious.[8-10,14] There is thus a consensus that the ability of the infectious HCVcc to reproduce the characteristics of native LVPs faithfully is probably limited by alterations of lipid metabolism.

Most HCV studies to date have been performed on dedifferentiated Huh7 cells and Huh7-derived clones (e.g., Huh7.5 and Huh7.5.1) under atmospheric oxygen tension (21% [vol/vol] O_2 [normoxia]). By contrast, the median O_2 tension in the hepatic lobules is 3% (vol/vol) O_2.[15,16] This rate falls to 1% (vol/vol) O_2 when measured at the cellular level,[17] constituting hypoxia relative to environmental oxygen tension. Low oxygen tension has nevertheless been shown to allow the surface expression of the very-low-density lipoprotein receptor, which favors viral entry, and to promote replication in the HCVcc cell culture model.[18,19] Furthermore, exposure to human serum, leading to partial differentiation, tends to enhance VLDL secretion by Huh7 cells and clones.[20] A cell culture combining hypoxia and partial cell differentiation has already been shown to be permissive to experimental HCV infection.[19] Here, we hypothesized that this combination in the HCVcc might restore lipid metabolism, favoring completion of the viral cycle and the production of lipid-enriched LVPs.

We describe here the characterization, in terms of LVP lipidation, neutralization, and infectivity, of a cell culture model based on Huh7.5-differentiated cells cultured under prolonged low oxygen tension. This model is permissive to infection with the JFH1 isolate of HCV and produces highly infectious progeny viruses displaying strong biochemical and ultrastructural similarities to native LVPs.

Materials and Methods

CELLS AND TREATMENTS

Huh7.5 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/L

ARTICLE INFORMATION:

From the [1]INSERM U1259, Université de Tours and CHRU de Tours, Tours, France; [2]UMRS INSERM U1253 Imagerie et cerveau, Université de Tours, Tours, France; [3]Plate-Forme IBiSA des Microscopies, Université de Tours and CHRU de Tours, Tours, France; [4]Université de Tours, Equipe Associée 5501, CNRS Equipe de Recherche Labellisée 7001, LNOx Team, Tours, France.

ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Philippe Chouteau, Ph.D.
INSERM U1259, Faculté de Médecine, Université de Tours
10, Boulevard Tonnellé
37032 Tours, France
E-mail: philippe.chouteau@univ-tours.fr
Tel.: +33 (0)2 47 36 62 65

D-glucose and 4 mM L-glutamine (Invitrogen) and supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin (Invitrogen), and 10% fetal calf serum (Thermo Fisher Scientific). Undifferentiated Huh7.5 cells cultured in normoxia (Huh7.5^{Std}; 21% O_2 [vol/vol] [normoxia], 5% CO_2 [vol/vol], 74% N_2 [vol/vol]) were seeded in 12-well plates at a density of 8×10^4 cells/well 72 hours before use. Undifferentiated Huh7.5 cells cultured in hypoxia (Huh7.5^{Hypo}; 1% O_2 [vol/vol] [hypoxia], 5% CO_2 [vol/vol], 94% N_2 [vol/vol]) were used to seed 12-well plates at a density of 8×10^4 cells/well 72 hours before incubation for 5 days under hypoxia in a hypoxia workstation (HypoxyLab; Oxford Optronix). Differentiated Huh7.5 cells cultured in normoxia (Huh7.5^{Diff}) or differentiated Huh7.5 cells cultured in hypoxia (Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$) were seeded in 12-well plates coated with rat type I collagen (Sigma-Aldrich) at a density of 8×10^4 cells/well before use. For the differentiation of Huh7.5 cells, at 90% confluence, the cell-culture medium was replaced with complete DMEM supplemented with 1% DMSO (vol/vol). Cells were cultured for 14 days, during which time the medium was replaced with DMEM supplemented with 1% DMSO every 2 days (Huh7.5^{Diff}). Nine days after DMSO exposure, Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells were transferred to hypoxia and cultured for another 5 days.

Details of the other methods, materials, and reagents used, including antibodies, the cytotoxicity assay, the ultrastructural observations of cell–cell junctions, Real-Time PCR (RT-qPCR), indirect immunofluorescence and lipid droplet (LD) staining, HCVcc production and infection, the infectivity of the collected supernatants, neutralization assays, buoyant density on iodixanol gradient ultracentrifugation, lipoproteins, viral particle IC–TEM analysis, and statistical analyses are provided in the Supporting Information.

Results

Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ CELLS DISPLAY HEPATOCYTE-LIKE DIFFERENTIATION AND AN ADAPTIVE RESPONSE TO PROLONGED HYPOXIA

We combined two physiological characteristics of natural intrahepatic HCV infection (i.e., cellular differentiation and hypoxia) in a cell-culture model in which Huh7.5 cells were exposed to 1% DMSO for 14 days to promote differentiation and were cultured under sustained hypoxia (Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$) (Fig. 1). The ability of prolonged exposure (14 days) to 1% DMSO to induce differentiation has already been described for several cell lines, including Huh7.5 cells.[21,22]

Moreover, hypoxia-inducible factors (HIFs) are key transcription factors for the adaptation of cells to hypoxia.[23,24] The oxygen-regulated HIF-α subunit (1α/2α/3α) and the ubiquitous HIF-1β subunit interact in the nucleus as a complex with hypoxia-responsive element–containing gene promoters. Because nuclear translocation kinetics of the different HIF-α subunits may vary under hypoxia and are dependent on cell types,[25] we first determined the length of hypoxia necessary to achieve the complete nuclear translocation of HIF-1α and HIF-2α within Huh7.5 cells. One-percent (vol/vol) O_2 was selected because this rate was measured in cells *in vivo*.[17]

Our preliminary data showed that Huh7.5 cells exposed for 24 hours to 1% O_2 exhibited the complete nuclear localization of the stabilized HIF-1α, whereas HIF-2α was nearly exclusively contained in the perinuclear area of the cytoplasm (Supporting Fig. S1). The extensive nuclear distribution of both HIF-1α and HIF-2α was obtained later after 5 days of cell exposure to 1% O_2. This length of hypoxia exposure was chosen to achieve the experimental cell culture.

Huh7.5 cells not treated with DMSO and cultured in normoxia (Huh7.5^{Std}), corresponding to a standard Huh7.5 cell culture, DMSO-treated Huh7.5 cells in normoxia (Huh7.5^{Diff}), and Huh7.5 cells not treated with DMSO and cultured in hypoxia (Huh7.5^{Hypo}) were used as controls (Fig. 1). The long-term exposure of Huh7.5 cells to both hypoxia and DMSO was not cytotoxic (Supporting Fig. S2). Although levels were elevated to a lesser extent than in Huh7.5^{Diff} cells, the levels of mRNA for specific hepatic differentiation markers (albumin, alpha-1-antitrypsin [A1AT], and cytochrome p450 [Cyp3A4]) were significantly higher (4-, 18- and 11-fold higher, respectively) in Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells than in Huh7.5^{Std} counterparts (Fig. 2A). These differentiation marker transcripts were also present at higher levels (6-, 25-, and 4-fold higher for albumin, A1AT, and Cyp3A4, respectively) in Huh7.5^{Hypo} cells than in the Huh7.5^{Std} culture, suggesting that long-term hypoxia may also favor Huh7.5 hepatocyte-like differentiation.

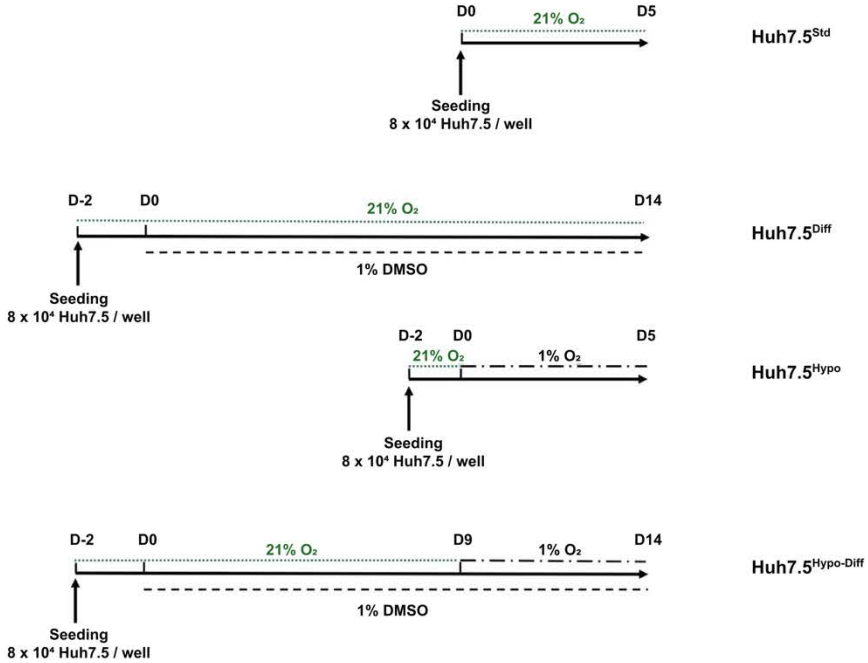


FIG. 1. Schematic diagram of the experimental procedure. Huh7.5^{Std} cells were undifferentiated control cells cultured for 5 days at high oxygen tension (normoxia - 21% O_2); Huh7.5^{Diff} cells were cultured for 14 days with 1% DMSO in normoxia; Huh7.5^{Hypo} cells were undifferentiated cells cultured for 5 days at low oxygen tension (hypoxia - 1% O_2) and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells were cultured for 9 days with 1% DMSO in normoxia and then for 5 days with 1% DMSO in hypoxia. Abbreviations: D0, day 0; D-2, day -2; D5, day 5; D9, day 9; D14, day 14.

To test this hypothesis and for each cell culture, we used TEM to perform an ultrastructural analysis of the cell–cell junctions (Fig. 2B). Enrichment in adherent cell–cell junctions is a characteristic of well-differentiated cells, whereas nonadherent junctions are a hallmark of cell dedifferentiation that has been recognized as characteristic of tumor cells.[26,27] We found that only DMSO-treated cells (Huh7.5^{Diff} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$) presented adherent cell–cell junctions, confirming that hypoxia alone is not sufficient for the full induction of Huh7.5 cell differentiation. Taken together, these data indicate that Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells have achieved partial hepatocyte-like differentiation.

We also investigated whether the adaptive response to prolonged hypoxia could be impaired by DMSO-induced differentiation by determining whether HIF-1α and HIF-2α were stabilized and transcriptionally functional in Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells. HIF-1α and HIF-2α were not detected in Huh7.5^{Std} and Huh7.5^{Diff} cell nuclei on immunofluorescence analyses, whereas both transcription factors were found to have an extensive nuclear distribution in Huh7.5^{Hypo} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells (Fig. 2C). Thus, the stabilization and nuclear translocation of HIF-1α and HIF-2α facilitated by low oxygen tension were not impaired by long-term exposure to DMSO. We also found that stabilized HIF-1α and HIF-2α were efficient for transcription in both sets of hypoxic conditions (Huh7.5^{Hypo} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$), as the levels of mRNA for a number of target genes (glucose transporter 1 [*GLUT1*], vascular endothelial growth factor A [*VEGFa*], phosphoglycerate kinase 1 [*PGK1*], differentiated embryo chondrocyte 1 [*DEC1*], and erythropoietin [*EPO*]) were higher in Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells than in Huh7.5^{Std} cells (18-fold higher for *GLUT1 and VEGFa*; 11-, 12-, and 185-fold higher for *PGK1*, *DEC1*, and *EPO*, respectively) (Fig. 2D). Although these relative quantities were close to those obtained in Huh7.5^{Hypo} conditions, almost no transcriptional activation of these HIF target genes was observed in DMSO-treated cells cultured in normoxia (Huh7.5^{Diff}).

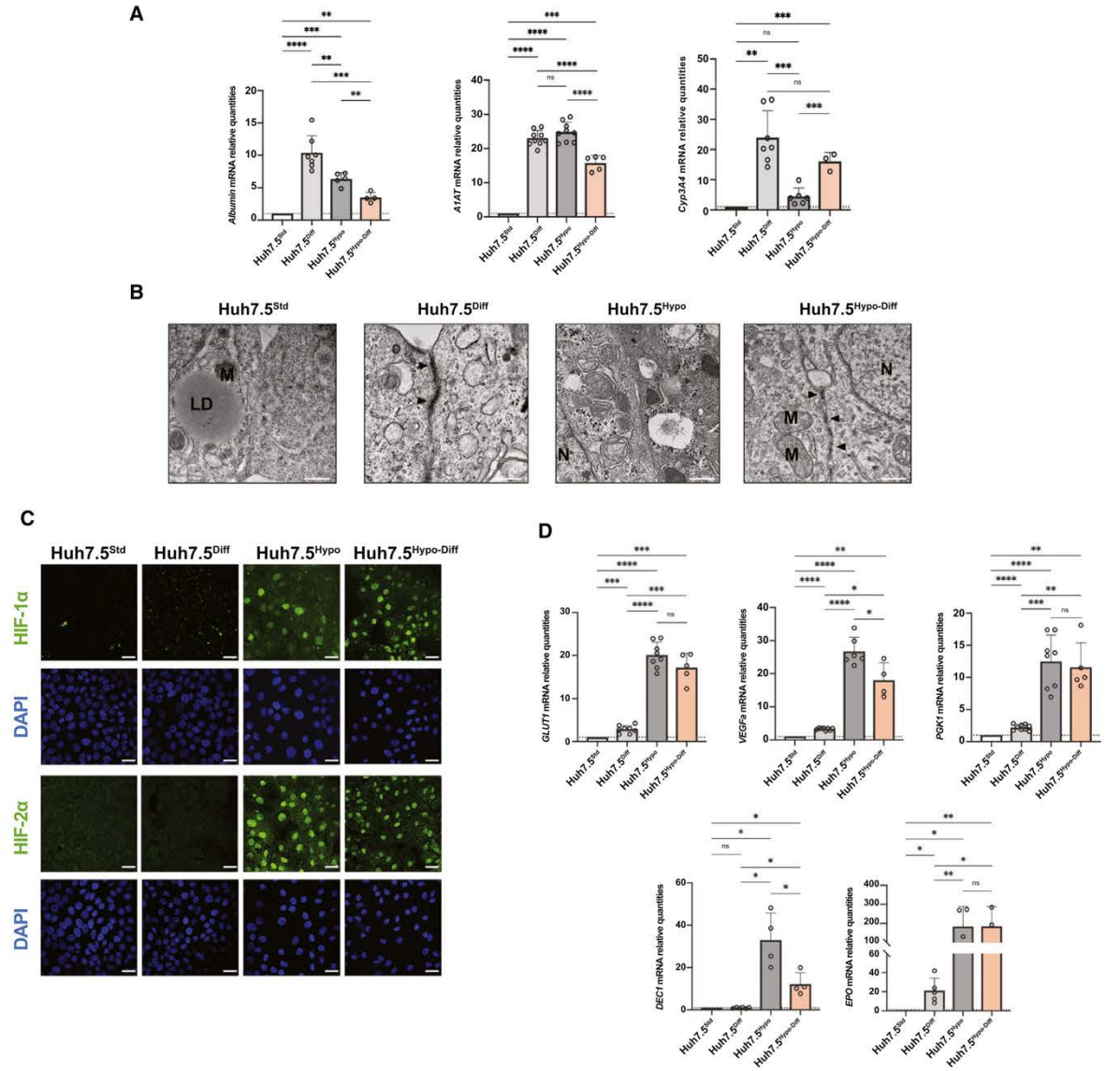


FIG. 2. A combination of DMSO and prolonged exposure to low oxygen tension leads to partial Huh7.5 differentiation and an adaptive response to hypoxia. (A) Levels of mRNA for albumin, alpha 1 anti-trypsin (*A1AT*) and cytochrome P450 (*Cyp3A4*) were measured in triplicate by RT-qPCR in three independent experiments. Relative expression levels were obtained by normalization relative to β-actin and compared with those for Huh7.5^{Std} cells. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$ (Welch's *t*-test). (B) Representative electron micrographs of the various cell cultures. Adherent cell-cell junctions are indicated by black arrowheads. Scale bars = 500 nm. (C) Indirect immunofluorescence for HIF-1α and HIF-2α (green). Nuclei are shown in blue (DAPI). Scale bars = 25 μm. (D) Levels of mRNA for glucose transporter 1 (*GLUT1*), vascular endothelial growth factor A (*VEGFa*), phosphoglycerate kinase 1 (*PGK1*), differentiated embryo chondrocyte expressed gene 1(*DEC1*) and erythropoietin (*EPO*), as determined by RT-qPCR performed in triplicate in at least three independent experiments. Relative expression levels were obtained by normalization relative to β-actin and compared with those for Huh7.5^{Std} cells. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$ (Unpaired two-tailed Student *t* test). Abbreviations: LD, lipid droplet; M, mitochondria; N, nuclei; ns, not significant.

Together, these results show that Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells are both partially differentiated and present an adaptive response to prolonged hypoxia. This cell culture model is thus closer to the natural hepatocyte environment than the cell culture models currently used for *in vitro* studies of the HCV life cycle.

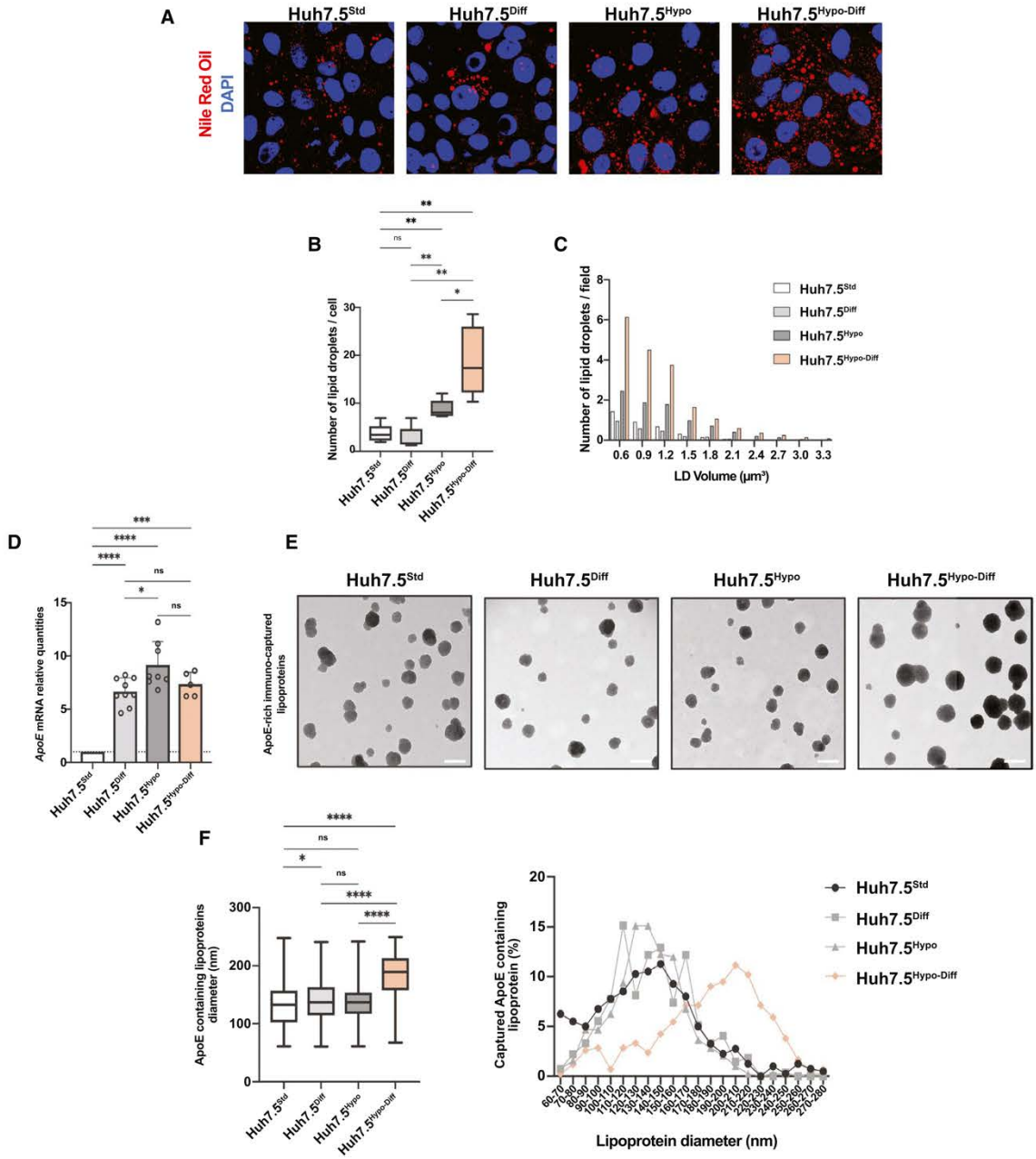


FIG. 3. The ApoE-rich lipoprotein secretion pathway is enhanced in Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells. (A) Representative images of three independent replicates of staining for intracellular lipid droplets and cell nuclei with Nile Red Oil (red) and DAPI (blue), respectively. Five randomly chosen fields were captured and the number per cell (B) and volume (C) of lipid droplets were determined with MatLab software. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (Welch's *t*-test). (D) Levels of ApoE mRNA determined by RT-qPCR, in triplicate, in three independent experiments. Relative levels of expression were obtained by normalization relative to β-actin and compared with those for Huh7.5^{Std} cells. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$ (Mann-Whitney test). (E) Representative electron micrographs of ApoE-rich lipoproteins immunocaptured from supernatants (see Methods for details). Scale bars = 200 nm. (F) Box-and-whisker plot of the mean size of immunocaptured ApoE-rich lipoproteins (Huh7.5^{Std}, n = 422; Huh7.5^{Diff}, n = 281; Huh7.5^{Hypo}, n = 382; Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$, n = 410). $^{*}P < 0.05$, $^{****}P < 0.0001$, ns = not significant (Unpaired two-tailed Student *t* test) (left panel). Size distribution of immunocaptured ApoE-rich lipoproteins as determined with ImageJ software (right panel). Abbreviation: ns, not significant.

Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ CELLS PRESENT LIPID FEATURES OF INTEREST FOR STUDIES OF THE HCV LIFE CYCLE

Intracellular neutral lipids[28,29] and apolipoprotein E (ApoE)-dependent lipoprotein secretion[30,31] are two of the key elements required for HCV–LVP assembly, morphogenesis, and egress from infected cells. We therefore characterized these two features in Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells. LDs, the organelles responsible for intracellular neutral lipid storage, were observed after staining with Nile Red Oil (Fig. 3A). Images were captured, and the number of LDs per cell was determined (Fig. 3B). Analyses clearly showed that Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells contained about 5-fold as many LDs as Huh7.5^{Std} cells (18.7 ± 3.2 LDs/cell and 3.6 ± 0.8 LDs/cell, respectively; $P < 0.001$) (Fig. 3A,B). Huh7.5^{Hypo} cells also had significantly larger numbers of LDs/cell than were observed in standard cell-culture conditions (8.7 ± 0.87 LDs/cell and 3.6 ± 0.8 LDs/cell, respectively; $P < 0.001$), but these differences were less marked than for Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells. Thus, a combination of differentiation and hypoxia is required for the marked intracellular accumulation of LDs in Huh7.5 cells. A volume-distribution analysis showed that most LDs had a small volume (less than 1.5 μm^3), whatever the cell culture conditions (Fig. 3C). However, unlike Huh7.5^{Std} and Huh7.5^{Diff} cells, which did not produce large LDs, Huh7.5^{Hypo} and most Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells contained a few organelles of more than 2.4 μm^3 in diameter. Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells even had some LDs of more than 3.3 μm^3 in diameter, a size not observed in the other cell culture conditions.

Thus, Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells highly display neutral lipid storage in the form of LDs. Interestingly, these cytoplasmic organelles are known to serve as an assembly platform for HCV.[28,32]

ApoE-dependent lipoprotein secretion was also characterized in Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cell culture and compared with that in standard cell-culture conditions. ApoE mRNA levels were significantly higher in Huh7.5^{Diff}, Huh7.5^{Hypo}, and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells than in Huh7.5^{Std} cells (6.6 ± 0.4, 9.1 ± 0.8, and 7.3 ± 0.5, respectively; $P < 0.0001$) (Fig. 3D). These data suggest that standard cell-culture conditions may restrict *ApoE* gene expression relative to cellular states closer to those observed *in vivo*. On the basis of this result and the fact that HCV follows the lipoprotein secretory pathway for LVP egress,[33,34] we performed a morphological characterization of the ApoE-rich lipoproteins secreted by Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells. Using an ApoE-directed IC of extracellular lipoproteins followed by TEM analysis, we generated images of the ApoE-rich lipoproteins produced in the different cell-culture conditions (Fig. 3E). We calculated the mean size of the secreted lipoproteins. Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells clearly produced significantly larger ApoE-rich lipoproteins than Huh7.5^{Std}, Huh7.5^{Diff}, or Huh7.5^{Hypo} cells (181 ± 2.0, 131 ± 1.9, 138 ± 1.9, and 136 ± 1.5 nm, respectively; $P < 0.0001$) (Fig. 3F, left panel). The size distribution of these immunocaptured lipoproteins is also presented (Fig. 3F, right panel). Based on size analyses for about 281-422 different immunocaptured lipoproteins, our results clearly indicate a peak diameter for ApoE-rich lipoproteins of about 200-210 nm for Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells, whereas Huh7.5^{Std}, Huh7.5^{Diff}, and Huh7.5^{Hypo} cells produced smaller lipoproteins, with a maximum diameter of about 140-150, 110-120, and 130-140 nm, respectively. Thus, Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells produced larger ApoE-containing lipoproteins than cells in other culture conditions, including, in particular, the standard cell-culture conditions (Huh7.5^{Std}) conventionally used for HCV studies.

Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ CELLS ARE SUSCEPTIBLE TO HCV INFECTION AND PRODUCE HIGHLY INFECTIOUS VIRAL PARTICLES

Given the requirement of the lipoprotein secretion pathway for HCV–LVP morphogenesis, egress, and infectivity, we explored the susceptibility of Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells to HCV infection and the ability of these cells to produce infectious LVPs relative to standard cell-culture conditions. We thus infected Huh7.5^{Std}, Huh7.5^{Diff}, Huh7.5^{Hypo}, and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cell cultures with the HCVcc strain JFH1 at a multiplicity of infection of 0.01. Two days after infection, we quantified intracellular (Fig. 4A) and extracellular (Fig. 4B) HCV genomes by using RT-qPCR. Because of their long-term exposure to DMSO, Huh7.5^{Diff} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells are almost quiescent, unlike Huh7.5^{Std} cells (data not

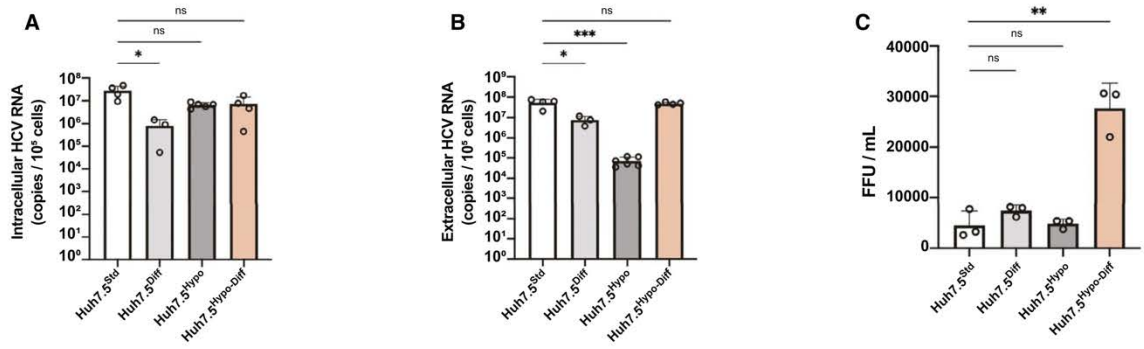


FIG. 4. Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells are susceptible to HCV infection and produce highly infectious viral particles. (A) Intracellular and (B) extracellularHCV RNA levels were measured by RT-qPCR, in triplicate, in four independent experiments, two days post HCVcc infection (JFH1, MOI = 0.01). Values are expressed as HCV genome copies/10^5 cultured cells. $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ (Unpaired two-tailed Student *t* test). (C) Supernatants of HCV-infected cells were collected and used to infect naïve cells. The infectivity of progeny viral particles was determined by indirect immunofluorescence assays on the HCV core protein, with the results expressed as FFU/mL for 10-fold serially dilutions of culture supernatants. $^{**}P < 0.01$ (Unpaired two-tailed Student *t* test). Abbreviations: FFU, focus-forming units; ns, not significant.

shown). To exclude bias in viral-load analyses, cells were counted at the time of RNA extraction, and the results were standardized per 10^5 cultured cells. The intra- and extracellular amounts of the viral genome were both significantly reduced in Huh7.5^{Diff} cells compared with cells from standard cell-culture conditions (intracellular: 815,818 ± 411,568 HCV RNA copies/10^5 cells and 27,772,965 ± 8,214,174 HCV RNA copies/10^5 cells, respectively [$P < 0.05$]; extracellular: 7,686,869 ± 2,266,343 HCV RNA copies/10^5 cells and 54,636,966 ± 11,889,015 HCV RNA copies/10^5 cells, respectively [$P < 0.05$]) (Fig. 4A,B). For JFH1-infected Huh7.5^{Hypo} cells, despite equivalent intracellular amounts of the HCV genome compared with standard cell-culture conditions, significantly less HCV RNA was detected in the supernatant (72,352 ± 14,966 HCV RNA copies/10^5 cells and 54,636,966 ± 11,889,015 HCV RNA copies/10^5 cells, respectively; $P < 0.001$). These values indicate a lower production efficiency in progeny viruses. Interestingly, the combination of differentiation and hypoxia (Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells) restored amounts of intra- and extracellular HCV genome to a level comparable with that achieved under standard cell-culture conditions. These results indicate that despite variations, differentiated and/or hypoxic Huh7.5 cells are susceptible to JFH1 infection and support the complete HCV viral cycle. HCVcc-containing extracellular medium from HCV-infected cells was incubated with naive Huh7.5 cells. (Fig. 4C). Three days after infection, the HCV core protein was stained, and this staining was used to calculate viral infectivity. Our results clearly demonstrate that progeny viruses produced by HCV-infected Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells were significantly, by about 6-fold, more infectious than those produced by JFH1-infected Huh7.5^{Std} and Huh7.5^{Hypo} cells and about 4-fold more infectious that those produced by JFH1-infected Huh7.5^{Diff} cells (27,666 ± 2,834, 4,555 ± 1,634, 4,866 ± 533, and 7,466 ± 636 focus-forming units/mL, respectively; $P < 0.01$). Thus, partially differentiated Huh7.5 cells cultured in conditions of prolonged hypoxia are permissive to JFH1 infection and produce many more infectious HCV particles than cells grown in differentiation, hypoxia, or standard cell-culture conditions.

Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ CELLS PRODUCE HIGHLY LIPIDATED LVPs THAT HARBOR A NATIVE-LIKE CONFORMATION OF THE ENVELOPE GLYCOPROTEIN E1E2 COMPLEX

The production, by Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells, of large, probably highly lipidated, ApoE-containing

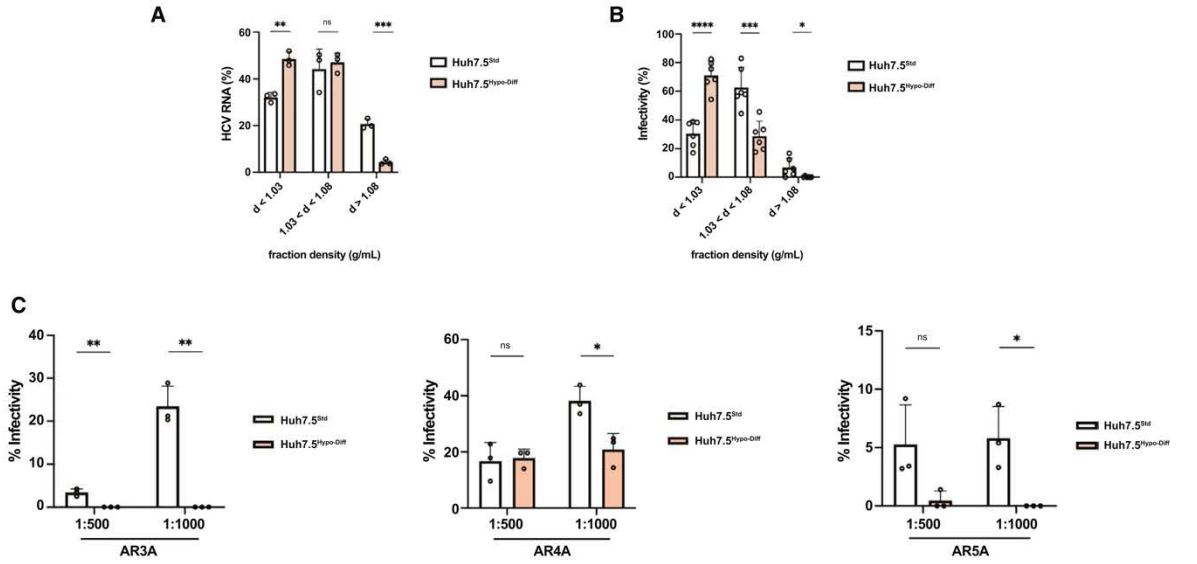


FIG. 5. Highly infectious HCV particles produced by Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells share viral density and envelop glycoproteins organization with native LVPs. (A) Supernatants of JFH1-infected Huh7.5^{Std} and Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells were fractionated on iodixanol gradients and subjected to ultracentrifugation. HCV RNA was quantified by RT-qPCR on each fraction harvested and the results are expressed as a % of total HCV RNA. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ (Unpaired two-tailed Student *t* test). (B) The infectivity of each of the fractions collected was determined with naïve cells and indirect immunofluorescence assays for the HCV core protein. FFU were counted and the results are expressed as the % infectivity (FFU/mL) of fractions with densities < 1.03 g/mL, between 1.03 and 1.08 g/mL and > 1.08 g/mL. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$ (Unpaired two-tailed Student *t* test). (C) Supernatants from JFH1-infected Huh7.5^{Std} and Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells were incubated with an anti-HIV1 GP120 antibody or with conformational antibodies targeting E2 (AR3A) or E1E2 complexes (AR4A, AR5A) (1:500 and 1:1000 dilutions) and were then used to infect naive cells. The infectivity of Ab-incubated progeny viral particles was determined by indirect immunofluorescence assays on the HCV core protein. The results are expressed as the % infectivity of Ab-diluted Huh7.5^{Std} and Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cell supernatants relative to anti-HIV1 GP120 antibody incubated supernatants. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$ (Welch's t test). Abbreviation: ns, not significant.

lipoproteins (Fig. 3E,F) raised the question of whether the highly infectious LVPs produced by HCV-infected Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells were also more lipidated than the LVPs produced in standard cell-culture conditions. We first determined the relative amounts of HCV RNA present in fractions of various densities isolated from the supernatants of HCV-infected Huh7.5^{Std} and Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells after iodixanol density gradient centrifugation (Fig. 5A). We obtained contrasting results for low-density fractions (density < 1.03 g/mL), for which the HCV genome was significantly more abundant in Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ than in the equivalent fractions of Huh7.5^{Std} cells (48.5 ± 1.8% and 32.1 ± 1.1%, respectively; $P < 0.01$), and for high-density fractions (density > 1.08 g/mL), in which the amounts of Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$-associated viral RNA were lower (by a factor of almost 5) than the amounts of viral RNA in Huh7.5^{Std} fractions (4.4 ± 0.6% and 20.7 ± 1.2%, respectively; $P < 0.001$). Thus, HCV-infected Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells produce LVPs with a significantly lower density, consistent with higher lipidation levels, than those produced by Huh7.5^{Std} cells. We then investigated whether these fractions were infectious (Fig. 5B). Our results clearly demonstrated that 71.1% of the infectious LVPs produced by HCV-infected Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells were associated with the lowest-density fractions (density < 1.03 g/mL), whereas 62.7% of the infectious LVPs of Huh7.5^{Std} cells had higher densities (1.03 < density < 1.08 g/mL). These results indicate that infected Huh7.5$^{\text{Hypo-Diff}}$ cells produce LVPs with a very low buoyant density, a feature consistent with the secreted virions being highly lipidated, an attribute of the HCV particles isolated from the serum of infected humans.

We then checked whether the conformation of the envelop glycoprotein heterodimers E1 and E2

present at the surface of LVPs might be impacted by the combination of both differentiation and hypoxia. The neutralization efficacy of conformational monoclonal antibodies targeting E2 or the E1E2 complex (AR3A and AR4A, AR5A, respectively)[35] was thus evaluated. Although AR3A targets a conformational epitope in E2, AR4A and AR5A recognize unique epitopes outside the cluster of differentiation 81 receptor binding site and bind to the native E1E2 heterodimer and do not bind denatured E1E2 or either E1 or E2 alone.[35,36] These neutralizing antibodies (nAbs) have been designed from an antibody antigen-binding fragment phage-display library generated from a donor chronically infected with HCV (Fig. 5C).[35] Supernatants of JFH1-infected Huh7.5^{Std} or Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells were subjected to preincubation with 1:500 and 1:1,000 dilutions of antibodies (AR3A, AR4A, or AR5A or irrelevant anti-HIV1 glycoprotein 120 [GP120]) before infection of naive Huh7.5 cells (Fig. 5C). Seventy-two hours after infection, infectivity was assessed by means of HCV core protein indirect immunofluorescence assays. The results are expressed as the percentage of infectivity of nAb-incubated cell supernatants relative to their anti-HIV1 GP120–incubated counterparts. Our results confirmed that AR3A, AR4A, and AR5A antibodies efficiently neutralize LVPs produced by HCV-infected Huh7.5^{Std} cells in a dose-dependent manner. Remarkably, LVPs produced by HCV-infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells were significantly much more sensitive to nAbs than LVPs produced by infected Huh7.5^{Std} cells. Of note, infections of Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ LVPs were completely neutralized with AR3A (anti-E2) and AR5A (anti-E1E2) at a 1:1,000 antibody dilution.

Taken together, these results show that partially differentiated JFH1-infected Huh7.5 cells exposed to prolonged hypoxia produce infectious and highly lipidated LVPs composed of viral E1E2 complexes that present a conformation close to native LVPs.

THE LVPs PRODUCED BY HUH7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ CELLS AND NATIVE LVPs ARE MORPHOLOGICALLY SIMILAR

We characterized the ultrastructure of LVPs produced by HCV-infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells by using a methodological approach we developed in a previous study.[13] This method involves trapping LVPs on an electron microscopy grid with a conformational anti-E1E2 antibody (AR5A) and observing them by using TEM. The IC of HCV-LVPs is specific because grids not incubated with the AR5A antibody fail to trap viral particles (Supporting Fig. S3). Here, we confirmed that HCV-infected Huh7.5^{Std} cells produced small, poorly lipidated LVPs (Fig. 6A,B). These LVPs had a viral capsid (Fig. 6A,B, lower panel, red line) centered on the thin lipid layer (Fig. 6A,B, lower panel, green line). By contrast, the LVPs generated by HCV-infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells were characterized by the presence of a thick lipid coat, whatever the size of the viral particle (Fig. 6C,D). Interestingly, the position of the viral capsid was more asymmetric in larger LVPs (Fig. 6C,D, lower panel, red and green lines). A large lipid crown and an asymmetric position of the capsid were reported for LVPs isolated from the serum of HCV-infected patients.[13] We also observed variation for capsid size (Fig. 6C,D). Such variability had already been noted for LVPs isolated from infected individuals.[13,37] These features may result from the unique nature of HCV capsid symmetry, which is neither spherical nor icosahedral, with the capsid instead resembling a nonrigid, egg-shaped structure.[13,37] The variations of size and morphological features observed for the capsid therefore depend on the positioning of the LVP on the grid. The LVPs produced by infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells had a median diameter that was 40 nm greater than that of the LVPs produced by Huh7.5^{Std} cells (median size of 152 ± 3 and 108 ± 4 nm, respectively; $P < 0.0001$) (Fig. 6E, left panel). The size distribution of these Huh7.5^{Std}- and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$-associated LVPs clearly reveals a shift toward larger particles in Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells relative to Huh7.5^{Std} cells (Fig. 6E, right panel). Indeed, 88% of Huh7.5^{Std} LVPs had a diameter no greater than 120-130 nm, whereas 72% of Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ LVPs had a diameter greater than or equal to these values. Consistent with the buoyant densities of the infectious LVPs produced by HCV-infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells (Fig. 5C), these results, based on ultrastructural observations, confirm that large LVPs are highly lipidated. Remarkably, these LVPs have an ultrastructure similar to that of the particles from the serum samples of infected patients that we captured, observed, and analyzed.[13]

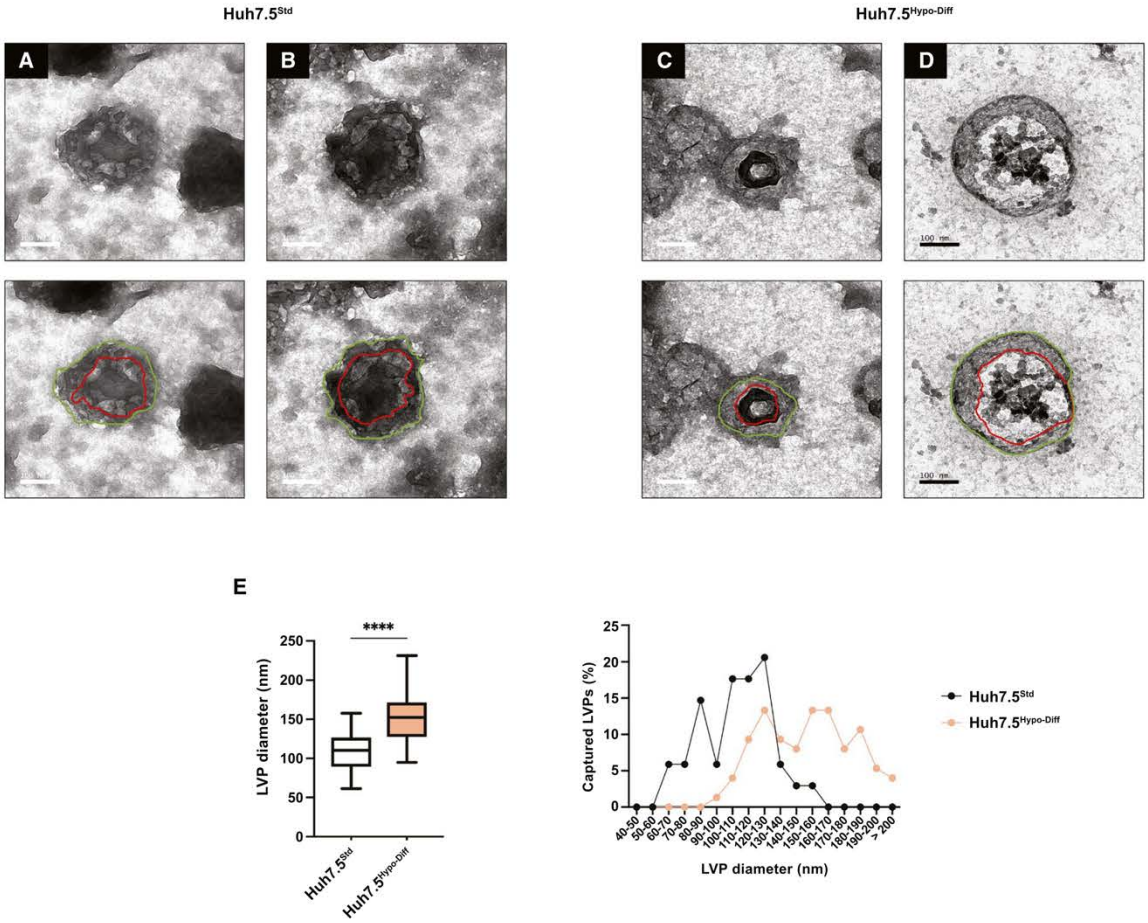


FIG. 6. JFH1-infected Huh7.5Hypo-Diff cells secrete viral particles with an ultrastructure similar to that of the lipo-viro-particles presented in serum samples from HCV-infected patients. (A) (B) (C) (D) Representative electron micrographs of lipo-viro-particles (LVPs) immunocaptured from the supernatants of JFH1-infected Huh7.5^{Std} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells (see Methods for details). Particles were stained with uranyl acetate dihydrate and observed in a JEOL 1400 electron microscope. The outer limit of the nucleocapsids (red) and of the LVPs (green) are drawn on the electron micrographs (lower panel). Scale bars: 100 nm. (E) Box-and-whisker plot of the mean size of the immunocaptured LVPs (Huh7.5^{Std}, $n = 34$; Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$, $n = 76$), $^{****}P < 0.0001$ (Unpaired two-tailed Student t test) (left panel) and immunocaptured LVP size distribution determined as with ImageJ software (right panel).

These results provide a demonstration that the combination *in vitro* of two key physiological characteristics observed during natural intrahepatic HCV infection (i.e., cellular differentiation and prolonged hypoxia) results in the production by HCV-infected Huh7.5 cells of highly infectious LVPs with biochemical and morphological features similar to those of the HCV particles produced during natural infection.

Discussion

The only system for HCV growth in cell culture that is currently widely available was developed 15 years ago from hepatocellular carcinoma–derived Huh-7 subclones.[6,7] During efforts to develop more physiological cell culture-based models, workable titers of infectious HCV also were obtained in growth-arrested Huh-7 cells,[20,22] Huh-7 cells

cultured in hypoxic conditions,[18,19] immortalized human hepatocytes,[38] and human fetal hepatocytes.[39] However, all of these cells diverge, to some extent, from the primary natural host cells of HCV, differentiated human adult hepatocytes, which are present in conditions of naturally low oxygen tension. It is therefore not possible, to study any hijacking or perturbation of normal hepatocyte functions by HCV completely or accurately with the existing systems.[40] We therefore used and characterized a described simple but robust system[19] for obtaining high titers of infectious particles that more closely mimics that isolated from human plasma.

Studies in the Huh-7 cell-based system have highlighted the crucial role of lipoprotein biogenesis in HCV morphogenesis, and, in particular, the requirement of ApoE for this process.[41,42] Indeed, we confirm here that Huh7.5^{Std} cells secrete lipid-poor ApoE-containing lipoproteins, asserting that these dedifferentiated cells cultured in normoxia do not fully reproduce the physiological pathways for the assembly and maturation of authentic, triglyceride-rich VLDLs.[10] By contrast, Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells secreted large ApoE-containing lipoproteins (Fig. 3), a property not shared by differentiated (Huh7.5^{Diff}) or hypoxic (Huh7.5^{Hypo}) cultures, highlighting the need to combine both differentiation and hypoxia to obtain active lipoprotein biogenesis. The composition of the HCV particles produced by Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ may, in turn, facilitate virus entry, explaining the observed higher infectivity of these particles (Fig. 4).

The infectious progeny viruses of HCVcc-infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells differed from the HCV particles that have been produced to date in Huh7 cell culture in that they have a lower mean buoyant density and a 6-fold higher infectivity (Figs. 4 and 5). The HCV circulating in the blood of patients is heterogeneous, but the most infectious fraction is that with the lowest buoyant density, corresponding to virus particles complexed with ApoE-containing, triglyceride-rich lipoproteins.[9,11] In addition, LVPs produced by JFH1-infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells are highly sensitive to the well-characterized conformational neutralizing monoclonal antibodies (AR3A, AR4A and AR5A) that specifically target conserved epitopes on viral envelop glycoproteins.[35,36] (Fig. 5C).

These data suggest that the combination of cell differentiation and sustained hypoxia allows the production of LVPs harboring native-like E1E2 envelop glycoprotein conformation. Overall, the high infectivity of LVPs produced by infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells could be at least partially explained by the accurate conformation of E1E2 at the surface of the produced viral particles.

Furthermore, the structural properties of HCV-infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ progeny viruses mimic those of infectious HCV produced *in vivo* (Fig. 6). As recently suggested,[43] it will be of interest to determine whether this efficient ultrastructure of infection is acquired during viral morphogenesis or after the egress of LVPs from infected cells. This cell culture–based model may also provide a more appropriate and accurate tool for detailed studies of the interactions of HCV and cellular factors. In particular, finely exploring the actors of intracellular lipid metabolism potentially subverted by HCV infection and viral protein expression, thereby causing an imbalance in cell homeostasis, may now be accessible with this cell-culture system. However, it will be important in future experiments to compare the composition of viral particles generated by HCV-infected Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells with that of particles produced in primary human hepatocytes or present in human serum samples.

As reported for standard Huh7 cells,[44,45] we were unable to infect this model with serum samples from HCV-infected patients (data not shown). Unlike HCVcc inocula allowing the reproducible production of measurable titers of infectious progeny, patient serum samples contain mixtures of HCV genomes, generally of unknown sequence, and other components likely to influence infectivity, such as nAbs, potentially accounting for the lack of consistency, the unpredictability, and the low efficiency of replication in cell cultures. Nevertheless, it will be important to determine in future investigations whether these observations can be extended to other genotypes. At this stage, it is difficult to use chimeric JFH1 viruses harboring the nonstructural proteins of various genotypes for this purpose because of their lower level of replication in the Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ model as compared with the wild-type genotype 2a JFH1 strain (data not shown).

Additionally, this cell culture model probably provides more appropriate and accurate conditions for studies of the life cycles and related cellular dysregulations associated with other hepatotropic viruses. For example, flaviviruses also affect host lipid functions and display strong similarities to HCV (see

Zhang et al.[46] for review). The most extensively studied flavivirus is dengue virus (DENV), for which LDs are used as a replication platform through a specific interaction with the capsid protein that is also a prerequisite for the interactions with ApoE-rich VLDLs required for DENV egress.[47] Interestingly, West Nile virus, a flavivirus closely related to DENV, also has a number of features in common with both host-cell LDs and host-cell VLDLs.[48] More interestingly, other viruses much more distantly related to this viral family may also modify host lipoprotein functions. For instance, it was recently demonstrated that hepatitis B virus infection and production are heavily dependent on human ApoE.[49] These examples suggest that the culture of hepatocyte-derived cell lines in an approach combining cell differentiation with prolonged hypoxia, which preserves important virus-related host lipid functions, may be very useful for studies of any virus that naturally targets hepatocytes.

In conclusion, the ability of this cell culture–based system to mimic the complete life cycle of HCV accurately may make it a model of choice for studies of HCV infection pathophysiology and for studies of other hepatotropic viruses and related cellular dysfunctions.

Acknowledgment: We thank Dr. Takaji Wakita (National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan) for kindly providing the JFH1 virus strain, Dr. Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, NY) for the Huh7.5 cell line, and Dr. Mansun Law (Scripps, San Diego, CA) for the AR3A, AR4A and AR5A antibodies. We thank Hassan Dakik and Margaux Deynoux (Equipe Associée 5501, National Center for Scientific Research Equipe de Recherche Labellisée 7001, Leukemic Niche and Redox Metabolism Team, Tours, France) for helpful discussions on hypoxia, and Christophe Baron, Denis Angoulvant, and Stéphanie Chadet (EA 4240 T2I, Tours, France) for providing assistance for the hypoxia workstation.

Author Contributions: J.C.: Design and execution of the experiments; data acquisition, analysis, and interpretation; writing of the paper. A.B.M.: Technical assistance. C.T.: lipid droplet analysis. J.B.G.: Technical assistance for electron microscopy. F.M.: Tools, theoretical and technical assistance for hypoxia. J.C.M.: Technical assistance and critical revision of the paper. P.R.: Critical revision of the paper. P.C.: Study design; data analysis and interpretation; writing of the paper; obtaining funding.

REFERENCES

1) **Li G**, **De Clercq E**. Current therapy for chronic hepatitis C: the role of direct-acting antivirals. Antiviral Res 2017;142:83-122.
2) Childs K, Davis C, Cannon M, Montague S, Filipe A, Tong L, et al. Suboptimal SVR rates in African patients with atypical genotype 1 subtypes: Implications for global elimination of hepatitis C. J Hepatol 2019;71:1099-1105.
3) Fourati S, Rodriguez C, Hézode C, Soulier A, Ruiz I, Poiteau L, et al. Frequent antiviral treatment failures in patients infected with hepatitis C virus genotype 4, subtype 4r. Hepatology 2019;69:513-523.
4) Pawlotsky J-M. DAA failures in African patients with "unusual" HCV subtypes: Hey! Didn't you know there was another world? J Hepatol 2019;71:1070-1072.
5) **Hamdane N**, **Jühling F**, Crouchet E, El Saghire H, Thumann C, Oudot MA, et al. HCV-induced epigenetic changes associated with liver cancer risk persist after sustained virologic response. Gastroenterology 2019;156:2313-2329.
6) **Wakita T**, **Pietschmann T**, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. Nat Med 2005;11:791-796.
7) Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. Science 2005;309:623-626.
8) Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. J Virol 2006;80:2418-2428.
9) **Lindenbach BD**, **Meuleman P**, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:3805-3809.
10) Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. Gastroenterology 2010;139:1355-1364.
11) André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. J Virol 2002;76:6919-6928.
12) **Vieyres G**, **Pietschmann T**. HCV pit stop at the lipid droplet: refuel lipids and put on a lipoprotein coat before exit. Cells 2019;8:233.
13) Piver E, Boyer A, Gaillard J, Bull A, Beaumont E, Roingeard P, et al. Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. Gut 2017;66:1487-1495.
14) Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:9505-9510.
15) **Jungermann K**, **Kietzmann T**. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. Hepatology 2000;31:255-260.
16) Rankin EB, Rha J, Selak MA, Unger TL, Keith B, Liu Q, et al. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. Mol Cell Biol 2009;29:4527-4538.
17) Carreau A, Hafny-Rahbi BE, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a

crucial parameter? Small molecules and hypoxia. J Cell Mol Med 2011;15:1239-1253.
18) Ujino S, Nishitsuji H, Hishiki T, Sugiyama K, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes VLDLR as a novel entry pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 2016;113:188-193.
19) Vassilaki N, Kalliampakou KI, Kotta-Loizou I, Befani C, Liakos P, Simos G, et al. Low oxygen tension enhances hepatitis C virus replication. J Virol 2013;87:2935-2948.
20) Steenbergen RHG, Joyce MA, Thomas BS, Jones D, Law J, Russell R, et al. Human serum leads to differentiation of human hepatoma cells, restoration of very-low-density lipoprotein secretion, and a 1000-fold increase in HCV Japanese fulminant hepatitis type 1 titers. Hepatology 2013;58:1907-1917.
21) Bauhofer O, Ruggieri A, Schmid B, Schirmacher P, Bartenschlager R. Persistence of HCV in quiescent hepatic cells under conditions of an interferon-induced antiviral response. Gastroenterology 2012;143:429-438.
22) Sainz B, Chisari FV. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. J Virol 2006;80:10253-10257.
23) Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. N Engl J Med 2011;365:537-547.
24) Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, et al. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1α and HIF-2α stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. J Biol Chem 2006;281:22575-22585.
25) Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1α and HIF-2α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2α promotes an aggressive phenotype. Cancer Cell 2006;10:413-423.
26) Paolillo M, Schinelli S. Extracellular matrix alterations in metastatic processes. Int J Mol Sci 2019;20:1-18.
27) Ogunwobi OO, Harricharran T, Huaman J, Galuza A, Odumuwagun O, Tan Y, et al. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. World J Gastroenterol 2019;25:2279-2293.
28) Boulant S, Targett-Adams P, McLauchlan J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. J Gen Virol 2007;88:2204-2213.
29) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat Cell Biol 2007;9:1089-1097.
30) Jiang J, Luo G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. J Virol 2009;83:12680-12691.
31) **Benga WJA**, **Krieger SE**, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. Hepatology 2010;51:43-53.
32) Galli A, Scheel TKH, Prentoe JC, Mikkelsen LS, Gottwein JM, Bukh J. Analysis of hepatitis C virus core/NS5A protein co-localization using novel cell culture systems expressing core-NS2 and NS5A of genotypes 1-7. J Gen Virol 2013;94:2221-2235.
33) Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:5848-5853.
34) Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. J Virol 2008;82:2120-2129.
35) Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. Nat Med 2008;14:25-27.
36) Giang E, Dorner M, Prentoe JC, Dreux M, Evans MJ, Bukh J, et al. Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109:6205-6210.
37) Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, et al. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. J Virol 2001;75:8240-8250.
38) **Kanda T**, **Basu A**, Steele R, Wakita T, Ryerse JS, Ray R, et al. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. J Virol 2006;80:4633-4639.
39) Lázaro CA, Chang M, Tang W, Campbell J, Sullivan DG, Gretch DR, et al. Hepatitis C virus replication in transfected and serum-infected cultured human fetal hepatocytes. Am J Pathol 2007;170:478-489.
40) von Hahn T, McKeating JA. In vitro veritas? The challenges of studying hepatitis C virus infectivity in a test tube. J Hepatol 2007;46:355-358.
41) Lee JY, Acosta EG, Stoeck IK, Long G, Hiet MS, Mueller B, et al. Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins. J Virol 2014;88:12422-12437.
42) **Chang KS**, **Jiang J**, **Cai Z**, Luo G. Human apolipoprotein E is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. J Virol 2007;81:13783-13793.
43) Denolly S, Granier C, Fontaine N, Pozzetto B, Bourlet T, Guérin M, et al. A serum protein factor mediates maturation and apoB-association of HCV particles in the extracellular milieu. J Hepatol 2019;70:626-638.
44) Pageaux G, Maurel P, Coste J, Larrey D, Fournier C, Ducos J, et al. In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. J Gen Virol 1998;79:2367-2374.
45) Buck M. Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures. PLoS One 2008;3:e2660.
46) Zhang J, Lan Y, Sanyal S. Modulation of lipid droplet metabolism—a potential target for therapeutic intervention in *Flaviviridae* infections. Front Microbiol 2017;8:1-17.
47) Faustino AF, Carvalho FA, Martins IC, Castanho MARB, Mohana-Borges R, Almeida FCL, et al. Dengue virus capsid protein interacts specifically with very low-density lipoproteins. Nanomed Nanotechnol Biol Med 2014;10:247-255.
48) Martins AS, Carvalho FA, Faustino AF, Martins IC, Santos NC. West Nile virus capsid protein interacts with biologically relevant host lipid systems. Front Cell Infect Microbiol 2019;9:1-12.
49) Qiao L, Luo GG. Human apolipoprotein E promotes hepatitis B virus infection and production. PLoS Pathog 2019;15:e1007874.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.31788/suppinfo.

Supplementary material and methods

Antibodies

Human monoclonal anti E2 (AR3A) and anti-E1E2 complex (AR4A and AR5A) antibodies(Giang et al., 2012) were kindly provided by Mansun Law (SCRIPPS, San Diego, USA). The following antibodies (Ab) were purchased: goat anti-HIV1 gp120 (ab 106578, abcam), mouse monoclonal anti-HCV core protein (C7–50, MA1–080, Thermo Fisher Scientific), mouse monoclonal anti-HIF-1α (clone 54, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA), rabbit anti-HIF-2α (Ab199, Abcam, Cambridge, UK), Alexa Fluor^{TM} 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (A11008, Invitrogen), Alexa Fluor^{TM} 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (11001, Invitrogen).

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was assessed in Huh7.5^{Std}, Huh7.5^{Diff}, Huh7.5^{Hypo} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells with the LIVE/DEAD^{TM} Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific). Briefly, after trypsin incubation, cell pellet was washed in PBS and incubated for 30 min at room temperature, in the dark, with the fluorescent reactive dye (1:1000). The cells were then washed in bovine serum albumin (BSA) 1% in PBS and analyzed by flow cytometry. The results are expressed as the percentage of LIVE/DEAD-positive cells.

Ultrastructural observations of cell-cell junctions

Cell-cell junctions were observed with a standard transmission electron microscopy (TEM). Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. They were then washed in PBS, post-fixed by incubation for 1 h with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Biosciences, Hatfield, PA, USA),

and dehydrated in a graded series of ethanol solutions. Cell pellets were embedded in Epon resin (Sigma-Aldrich), which was allowed to polymerize for 48 h at 60°C. Ultrathin (90 nm) sections were cut, stained with 5% uranyl acetate and 5% lead citrate, and deposited on electron microscopy grids coated with collodion membrane for examination under a Jeol 1400 transmission electron microscope (Tokyo, Japan) connected to a Gatan digital camera (Gatan, Pleasanton, USA) driven by Digital Micrograph software for image acquisition and analysis.

RT-qPCR

Total RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit and viral RNA with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA was synthesized with the ProtoScript II First-Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA), according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed with LightCycler 480 SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France). Amplification signals were analyzed with LightCycler 480 software. Gene and viral expression assay information are available below in Table 1 and in following technical comments:

Table 1: qPCR primer sequences

Primer	Sequences	
	Reverse (3' – 5')	Forward (3' – 5')
A1AT	GGCGGTATAGGCTGAAGG	TGCTGCCCAGAAGACAGAT
Albumin	GCCCTGTCATCAGCACATTC	CGCCTGAGCCAGAGATTTC
ApoE	GCAGGTAATCCCAAAAGCGAC	GTTGCTGGTCACATTCCTGG
CYP3A4	GGTTGAAGAAGTCCTCCTAAGC	TTCAGCAAGAAGAACAAGGACAA
DEC-1	GCTTGGCCAGATACTGAAGC	GTACCCTGCCCACATGTACC
EPO	CCATCCTCTTCCAGGCATAGAAA	AGGCCGAGAATATCAGACG
GLUT1	AGTCCAGGCCGAACACCT	ACAGAGTGAGCCCTTCTTCAA
JFH1	TCAGGCAGTACCACAAGGC	TCTGCGGAACCGGTGAGTA
PGK1	GCTGGCTCGGCTTTAACC	CAGCTGCTGGGTCTGTCAT
VEGFa	TGCATTCACATTTGTTGTGCTGTAG	TGCAGATTATGCGGATCAAACC
β-actin	CGTGGATGCCACAGGACT	ATTGGCAATGAGCGGTTC

Technical comments*: A1AT*, albumin, *ApoE*, *CYP3A4*, *DEC-1*, *EPO*, *GLUT1*, *PGK1*, *VEGFa*, and *β-actin* amplifications were performed as follows: 95°C for 5 minutes, 45 cycles of 95°C for 10 seconds, 60°C for 20 seconds, 72°C for 15 seconds. The final elongation was performed at 72°C for 10 minutes. The amplification ended with incubation at 40°C for 30 seconds.

Amplification with JFH1 primers was performed as follows: 95°C for 5 minutes, 45 cycles of 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds, 72°C for 20 seconds, with a final elongation at 72°C for 10 minutes. The amplification ended with incubation at 40°C for 30 seconds.

Indirect immunofluorescence and lipid droplet staining

Cells were grown on 12-mm glass coverslips and were fixed and permeabilized by incubation with 80% ice-cold acetone in PBS for 10 min at -20°C. Cells were washed three times in PBS and non-specific sites were saturated by incubation for 30 min at room temperature in 0.2% BSA in PBS. Cells were then labeled with an anti-HIF-1α (1:100) or an anti-HIF-2α (1:200) antibody, by incubation for 1 h at room temperature.

The cells were washed four times in PBS and incubated for 45 min at room temperature with an Alexa Fluor™-conjugated secondary antibody (1:2000) in the same buffer. Lipid droplets were stained directly, after the blocking of non-specific sites, by incubating cells with Nile Red Oil (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:1000 in acetone (from a 1 mg / mL stock solution). Cells were then mounted in a mixture of equal volumes of Fluoromount-G and DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, USA). Confocal microscopy was performed with an SP8 confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). We analyzed the size and number of lipid droplets per cell with MatLab software, for five representative fields in each set of conditions. The dynamic range of images was non-linearly modified to increase the contrast of lipid droplets. Morphological operators were used to homogenize the texture of droplets and improve their separation. Lipid droplets were then identified by two-stage circular Hough transform, with diameter boundaries representative of the observed droplets and with experimentally optimized sensitivity settings. Histograms of lipid droplet sizes were generated from data normalized by the number of cells in each image. For indirect immunofluorescence studies of core protein, a mouse monoclonal anti-HCV core protein (1:200) was incubated with the cells for 20 min at room temperature, and the cells were then incubated with an Alexa Fluor™ secondary antibody for 20 min at 37°C.

HCVcc production and infection

For HCVcc production, Huh7.5 cells were transfected with JFH1 RNA by electroporation (single pulse of 900 µF and 270 V), as previously described (Wakita et al., 2005). Supernatants were collected 48 and 72 h post-transfection, passed through a filter with 0.45 µm pores, and stored at -80°C. JFH1-transfected Huh7.5 cell

supernatants were harvested after three post-transfection passages, to obtain high HCVcc titers. HCVcc was titrated as previously described (Lindenbach et al., 2005). HCVcc infection experiments were performed for 6 h, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. The cells were then washed and cultured for an additional 48 h in the presence or absence of 1% DMSO, in normoxia or hypoxia, according to the cell culture conditions.

Infectivity of the collected supernatants

Fifty µL of fresh supernatant from JFH1-infected cells were transferred for 6 h onto 10,000 JFH1-naive Huh7.5^{Std} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells respectively, cultured in 96-well plates. The cells were thoroughly washed with PBS and incubated in complete DMEM, for 72 h. Indirect immunofluorescence analyses were then performed, as described above. Focus-forming units (FFU) were counted (Olympus IX 51, Tokyo, Japan), and the results are expressed as FFU/mL of supernatant from JFH1-infected cells.

Neutralization assays

Fresh JFH1-infected Huh7.5^{Std} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ supernatants were incubated with an irrelevant anti-HIV1 GP120 , or with AR3A, AR4A or AR5A (1:500 and 1:1000 dilution) antibodies, for 2 h at 37°C. Infectivity was then assessed as described above. The results are expressed as the % infectivity of Ab-incubated Huh7.5^{Std} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cell supernatants relative to anti-HIV1 GP120 antibody-incubated supernatants.

Buoyant density on iodixanol gradient ultracentrifugation

Fresh supernatants from JFH1-infected Huh7.5^{Std} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cells were overlaid on iodixanol gradients generated from equal volumes (2 mL) of 4, 13, 22, 31

and 40% (weight/weight) Optiprep (Sigma-Aldrich) solutions in gradient buffer (0.25 M sucrose, 0.5 M Tris pH = 8.0, 0.1 M EDTA pH = 8.8, 2 M $MgCl_2$, 2 M $MgSO_4$). Equilibrium was achieved by ultracentrifugation for 18 h at 250,000 x *g* in an SW41 rotor at 4°C in a Kendro Sorvall Discovery 90 SE ultracentrifuge. Twelve fractions (1 mL) were collected from the top. The viral genome was quantified in these fractions and the infectivity of the viral particles in each fraction was analyzed as described above. The density of each fraction was determined by measuring its mass.

Lipoproteins, viral particle immunocapture and TEM analysis

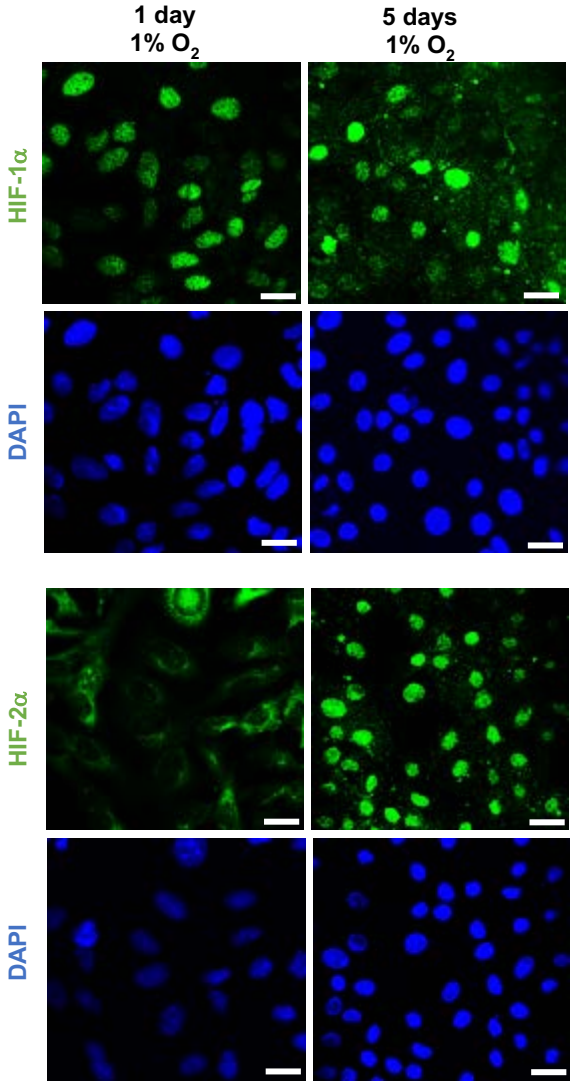
The formvar-carbon electron microscopy (EM) grids (S162, Oxford Instruments) were incubated with selected antibodies (ApoE or AR5A, 1:50) for 1 h at room temperature. Grids were washed in PBS and saturated by incubation with 5% BSA in PBS for 30 min at room temperature and then with cell supernatants with and without viral particles for 2 h at room temperature. The EM grids were washed with PBS and incubated in 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2 for 20 min. ApoE-containing lipoproteins or HCV particles trapped on grids were stained with 0.5% uranyl acetate for examination under a Jeol 1400 transmission electron microscope (Tokyo, Japan) connected to a Gatan digital camera driven by Digital Micrograph software (Gatan) for image acquisition and analysis. ApoE-containing lipoproteins and HCV particle size were analyzed with ImageJ software.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). The results are expressed as the mean±SEM of at least three sample replicates unless otherwise stated. The statistical significance of differences

was assessed in two-tailed Student's *t*-tests, Welch *t*-tests or Mann-Whitney tests, depending on the normality of the data and the homoscedasticity of the variance, as determined by Shapiro-Wilk tests and F tests, respectively. All *p* values below 0.05 were considered significant.

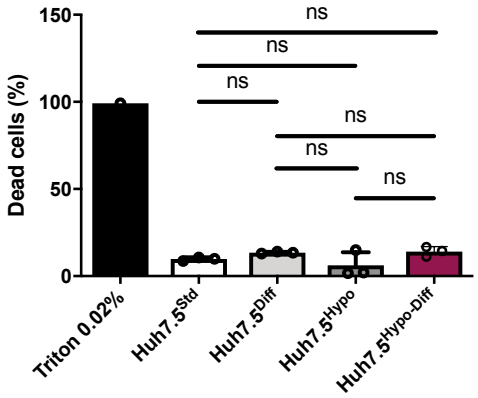
Supplementary data 1



A short-term of hypoxia induces HIF-1α but not HIF-2α nuclear distribution in Huh7.5 cells. The cells were subjected to 1% O_2 for 1 day (left panel) or 5 days (right

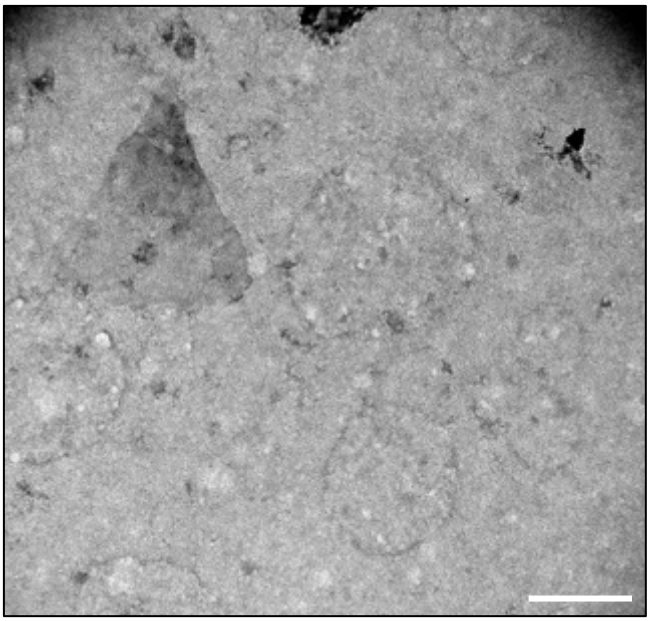
panel) before HIF-1α and HIF-2α immunofluorescent staining (green). Nuclei are shown in blue (DAPI). Scale bar = 25µm.

Supplementary data 2



The various cell culture conditions used were not associated with cytotoxicity. Cytotoxicity was assayed with the LIVE/DEAD^{TM} Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, according to the manufacturer's instructions, on Huh7.5^{Std}, Huh7.5^{Diff}, Huh7.5^{Hypo} and Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ cell cultures. The positive control for this assay was the incubation of Huh7.5^{Std} cells for 20 minutes in 0.02% Triton. The results are expressed as the percentage dead cells. ns = not significant (Mann-Whitney test).

Supplementary data 3



The absence of an immunocapture with a conformational anti-E1E2 antibody (AR5A) fails to trap HCV particles present in the supernatant of Huh7.5 infected cells. Representative electron micrograph of an HCV-infected Huh7.5^{Std} supernatant on TEM grids not previously subjected to the AR5A antibody incubation (see Supplementary material and methods, section "*Lipoproteins, viral particle immunocapture and TEM analysis"* for details). As shown, this approach fails to allow HCV particle observation**.** Scale bar = 500 nm.

1.7 Résultats complémentaires

1.7.1 Complément de caractérisation des acteurs du métabolisme lipidique d'intérêt pour le cycle du VHC

En complément des résultats qui ont été présentés ci-dessus, une étude connexe de l'expression de l'ApoE dans le modèle Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ a été entreprise. Comme indiqué dans les résultats principaux de la caractérisation des cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$, les quantités des ARNm d'ApoE étaient significativement augmentées dans ces cellules comparées aux cellules témoins Huh7.5^{Std} (**Figure 3D de l'article**). En cohérence, la quantité d'ApoE extracellulaire a ainsi été mesurée par ELISA (*Human APOE / Apolipoprotein E ELISA Kit* – RAB0613-AKT – Sigma-Aldrich) dans le surnageant des cellules Huh7.5^{Std} et Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ (**Figure 22**) et a révélé que les Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ sécrètaient environ 6,5 fois plus d'ApoE dans le surnageant que les Huh7.5^{Std}. Il a par ailleurs été montré que dans un modèle de culture de macrophages, l'apport ectopique d'acide oléique favorisait la sécrétion d'ApoE (Z. H. Huang et al., 2004) suggérant ainsi qu'un environnement lipidique riche, comme celui produit par les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$, pourrait stimuler la synthèse et la sécrétion d'ApoE.

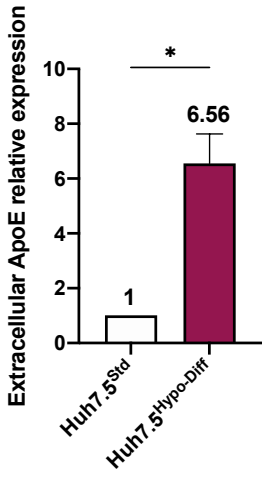


Figure 22. Les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ sécrètent significativement plus d'ApoE dans le milieu de culture que les cellules témoins Huh7.5^{Std}. *Mesure des quantités d'ApoE sécrétées dans le surnageant de culture par ELISA (Human APOE / Apolipoprotein E ELISA Kit – RAB0613-AKT – Sigma-Aldrich). Les résultats sont normalisés par les quantités d'ApoE sécrétées par les cellules Huh7.5^{Std}. * p < 0,05 (Welch's t-test).*

Une analyse de la localisation subcellulaire de l'ApoE, par marquage immunofluorescent suivie d'une observation au microscope confocal à fluorescence, a été réalisée (**Figure 23A**, panel du haut). Dans les cellules Huh7.5^{Std}, le phénotype d'expression correspondait à celui décrit dans la littérature pour ce type de cellules, c'est à dire un marquage diffus, probablement intra réticulaire. Dans les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$, en revanche, une fraction de l'ApoE semblait s'accumuler à la membrane plasmique. Ce résultat est cohérent avec certaines données de la littérature, décrivant qu'une partie de l'ApoE sécrétée à l'extérieur de la cellule, pouvait se réassocier aux héparanes sulfate situés sur la face externe de la membrane plasmique (Burgess et al., 1998; Kockx et al., 2018). De manière étonnante en revanche, une autre fraction de l'ApoE a été observée autour de structures intracellulaires sphériques, un phénotype absent des cellules Huh7.5^{Std}. Afin d'identifier ces structures, un co-marquage de l'ApoE avec le *Nile Red Oil*, permettant de marquer spécifiquement les lipides neutres stockés dans les GLs, a été effectué (**Figure 23A**, panel du bas). Dans les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$, l'ApoE était partiellement

localisée à la surface de grandes GLs. Ce résultat a été confirmé par un co-marquage avec l'ADRP, une protéine de surface des GLs (**Figure 23B**). Ainsi, dans les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$, à l'aide de ces deux approches complémentaires, nous confirmons que l'ApoE est partiellement localisée autour des GLs sans pour autant co-localiser parfaitement avec la protéine ADRP, attesté par l'absence de superposition des deux canaux. Ce résultat diverge des données de la littérature qui décrivent l'ApoE comme une protéine résidente du RE dans les cellules Huh7.5^{Std}. Ainsi, à ce stade de nos données, et afin de mieux comprendre ce phénotype, des analyses fines en microscopie électronique sont envisagées par une approche en marquages immunogolds (anticorps marqués de bille d'or) de l'ApoE dans les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$. Cette technique permet en effet d'observer la localisation de protéines avec une bien meilleure résolution que la microscopie confocale.

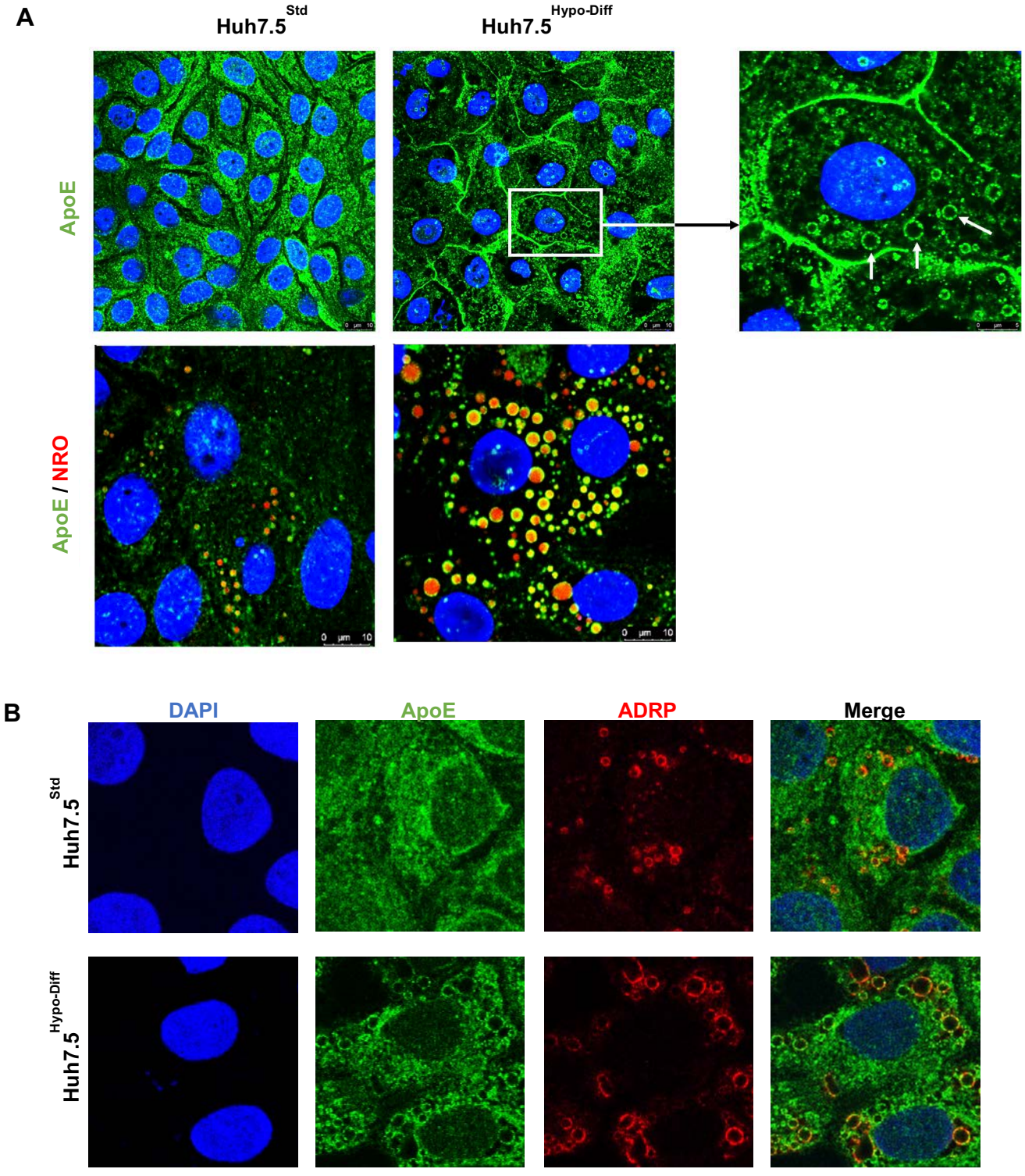


Figure 23. Localisation intracellulaire de l'ApoE dans les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$. ***(A)*** *Détection par immunofluorescence de l'ApoE (vert) (panel du haut) et des lipides neutres stockés dans les GLs (Rouge - Nile Red Oil – NRO) (panel du bas) dans les cellules Huh7.5^{Std} et Huh7.5$^{Hypo-Diff}$. Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Un agrandissement de l'image est proposé à droite de la figure. (**B**) Détection par immunofluorescence de l'ApoE (vert) et de l'ADRP (rouge) dans les cellules Huh7.5^{Std} et Huh7.5$^{Hypo-Diff}$. Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu).*

1.7.2 Localisation intracellulaire des protéines structurales du VHC

Compte tenu de ces résultats et de l'importance respective de l'ApoE et des GLs dans les étapes tardives du cycle du VHC, une analyse de la localisation des protéines virales structurales a été réalisée. Ainsi, les cellules Huh7.5^{Std} et Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ ont été infectées par le clone infectieux JFH1 (MOI 0,01) et 48 heures post-infection, les cellules ont été soumises à un co-marquage immunofluorescent permettant de visualiser la protéine core et les hétérodimères de glycoprotéines d'enveloppe E1E2 dans leur conformation native, grâce à un anticorps conformationnel (AR5A) (Giang et al., 2012) (**Figure 24A)**. Le phénotype d'expression de la protéine core apparaissait punctiforme dans les cellules Huh7.5^{Std} infectées, avec de timides arrangements en cercles, conformément aux données de la littérature, attestant d'une localisation à la surface de petites GLs. Ce phénotype était en revanche beaucoup plus visible dans les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ car la taille des GLs dans ces cellules y est significativement plus importante (voir **Figure 3** de l'article). Concernant les hétérodimères des glycoprotéines d'enveloppe E1E2, le marquage observé dans les Huh7.5^{Std} était conforme à celui décrit dans la littérature (*e.i.* diffus dans le cytoplasme). Ce phénotype d'expression était partiellement conservé dans les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$. Cependant, une partie de ces hétérodimères E1E2 était observée autour de structures sphériques et co-localisant avec la protéine core. Après vérifications, nous avons confirmé que ce marquage était spécifique et ne résultait pas de chevauchements entre les deux canaux d'émission de fluorescence. Un co-marquage des hétérodimères E1E2 et des GLs par le *Nile Red Oil* (**Figure 24B**) a permis de confirmer que ces structures sphériques étaient bien des GLs. Ainsi, de manière surprenante, les hétérodimères de

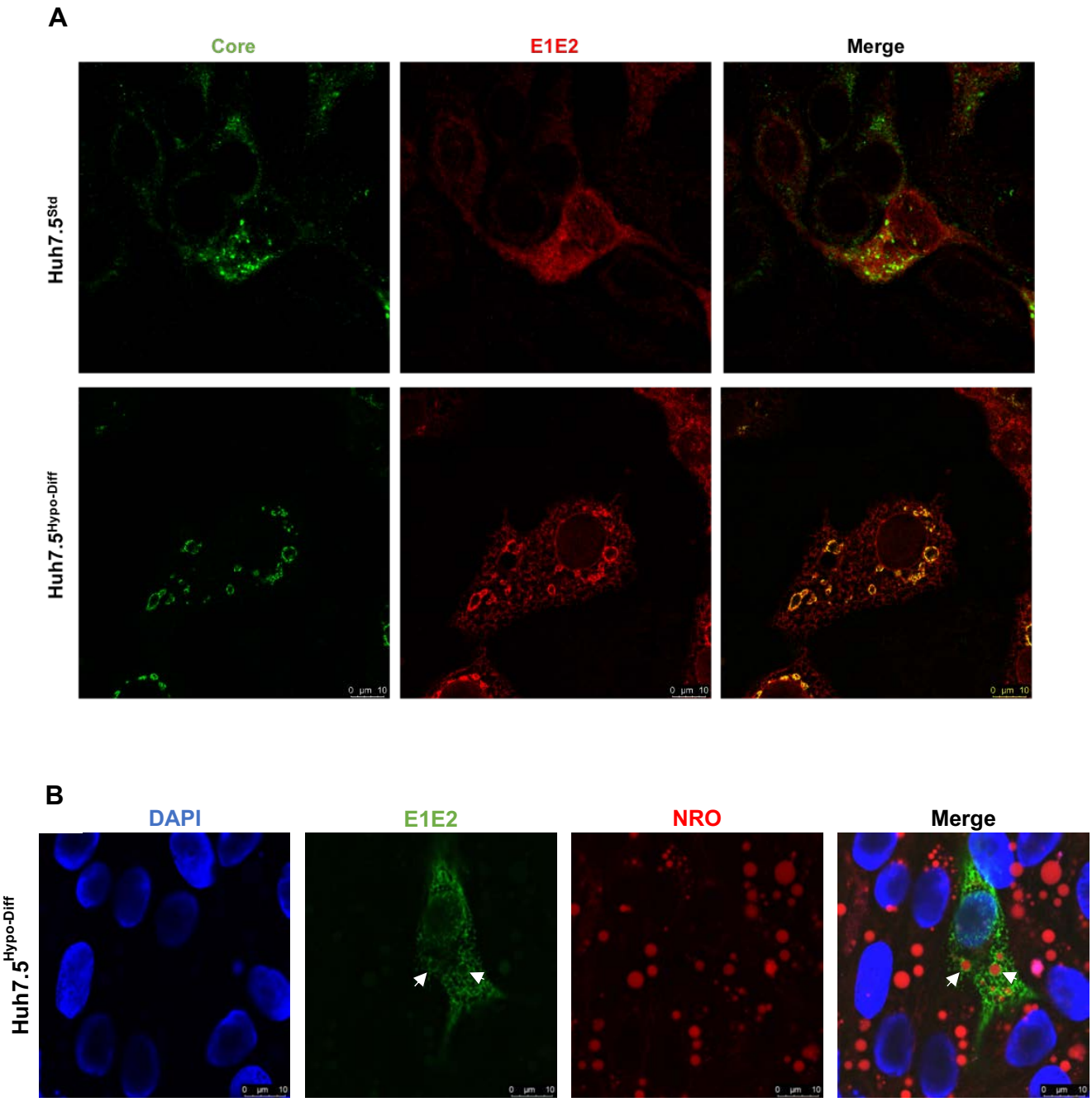


Figure 24. Les hétérodimères des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 du VHC sont partiellement co-localisés avec la protéine core autour des GLs dans les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$. *(**A**) Détection par immunofluorescence de la protéine de capside (vert) et des hétérodimères E1E2 (rouge) dans les cellules Huh7.5^{Std} et Huh7.5$^{Hypo-Diff}$, 48 heures post-infection par le clone infectieux JFH1 du VHC. (**B**) Détection par immunofluorescence des hétérodimères E1E2 (vert) et des GLs, (NRO - rouge) dans les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff,}$ 48 heures post-infection. Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Les flèches blanches montrent les zones d'intérêt. Barre d'échelle = 10µm.*

glycoprotéines d'enveloppe E1E2 sont partiellement co-localisés, avec la protéine core, à la surface des GLs dans les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$.

Il semble ainsi, que dans notre modèle expérimental, 3 acteurs majeurs de l'assemblage et de la morphogenèse virale sont spatialement proches, à la surface des GLs : la protéine core, les hétérodimères des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 dans leur conformation native et l'ApoE. La séquence protéique du complexe E1E2 indique la présence de divers domaines transmembranaires décrits comme étant enchâssés dans la membrane du RE (voir section Introduction 1.3.2.3 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, **Figure 5**). Afin de déterminer si cette localisation était dépendante ou non d'une ou d'autres protéine(s) virale(s), les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du clone JFH1 ont été exprimées de façon ectopique par transfection (plasmide pE1E2-JFH1) dans les cellules Huh7.5^{Std} et Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$, sans apport d'autres protéines virales. Soixante-douze heures post-transfection, un co-marquage immunofluorescent des hétérodimères E1E2 détectés dans leur conformation native (anticorps AR5A) et des GLs a été réalisé (**Figure 25**).

Le phénotype d'expression des hétérodimères E1E2 dans les cellules Huh7.5^{Std} transfectées était équivalent à celui observé dans le cadre d'une infection avec le clone infectieux JFH1 (**Figure 24**). Cependant, la localisation autour des GLs de ces hétérodimères dans les cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ transfectées semblait beaucoup moins prononcée que dans les cellules infectées avec le virus entier. Ces résultats, bien que préliminaires, tendent à montrer que l'expression de E1E2 à la surface des GLs soit dépendante d'au moins une autre protéine virale.

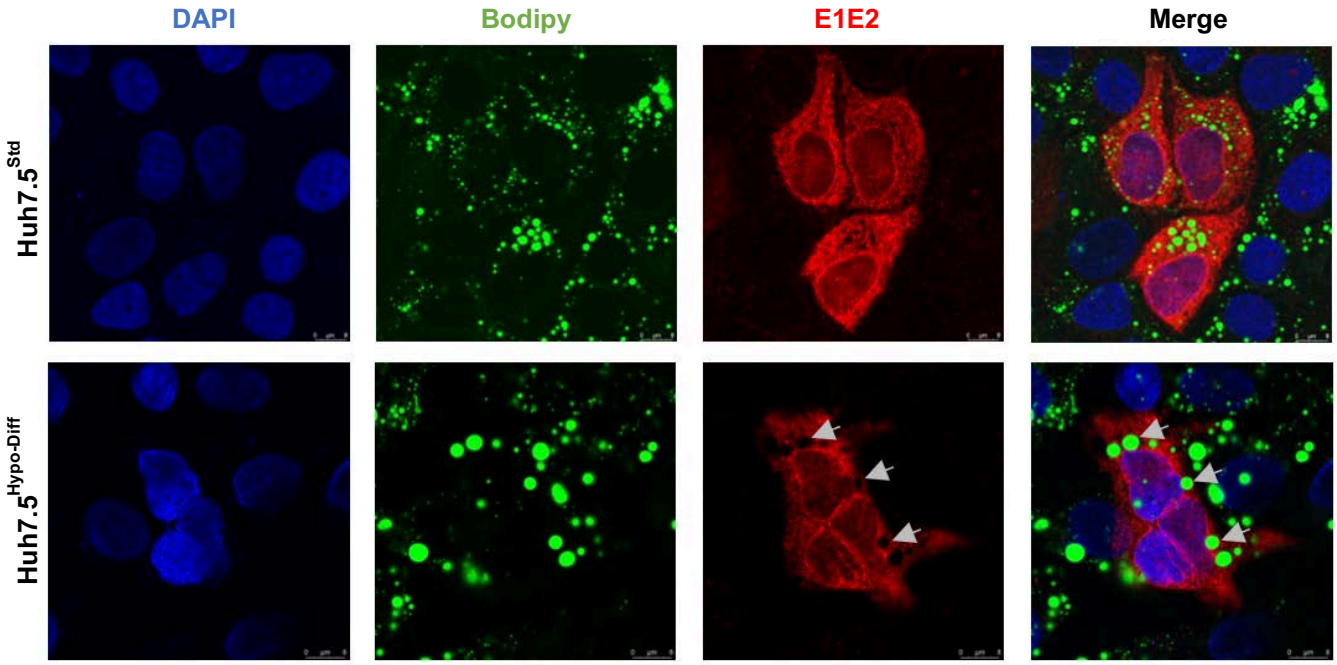


Figure 25. La localisation des hétérodimères des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 du VHC autour des GLs dans les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ nécessite l'expression d'une ou d'autres protéines virales. *Les cellules Huh7.5^{Std} et Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ ont été transfectées par 2µg du plasmide pE1E2-JFH1 au moyen de Fugene (Promega). Soixante-douze heures post transfection, hétérodimères E1E2 (rouge) ont été détectées par immunofluorescence. Les GLs ont été révélées en vert (Bodiby). Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Les flèches blanches montrent les zones d'intérêt. Barre d'échelle = 8µm.*

La protéine core pourrait être responsable de cette localisation car elle est par ailleurs impliquée dans le recrutement autour des GLs d'une autre protéine virale, la protéine NS5A (Miyanari et al., 2007). Afin de tester cette hypothèse, la co-expression par transfection de la protéine core et des deux glycoprotéines d'enveloppe E1E2 est prioritairement envisagée. Nous ne manquerons pas en outre d'examiner avec finesse la localisation intracellulaire des autres protéines virales au regard du positionnement des GLs et de l'ApoE. Ici encore, des marquages par immunogold suivi d'observations par TEM nous permettront d'affiner ces détections.

Ainsi, l'ensemble de ces données offre un regard nouveau sur les étapes tardives du cycle intracellulaire du VHC, qui demeurent encore relativement mal comprises. Les conditions expérimentales de culture des cellules, plus respectueuses de

l'environnement de l'infection naturelle, le permet. Il n'est ainsi pas exclu que, compte tenu des divergences de fonctions cellulaires observées avec les modèles standards (pseudo-différenciation, activation des HIFs, stockage important de lipides neutres, sécrétion des lipoprotéines), la morphogenèse du VHC présente d'importantes variations vis-à-vis de celle jusqu'alors décrite. Il faudra pour cela que ces résultats préliminaires très encourageants soient confirmés et compléter.

II. Étude 2 : Infection des cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ par le virus de la Dengue

2.1 Situation du sujet avant la thèse

Le DENV est un virus de la famille des *Flaviviridae* et du genre Flavivirus dont le génome, un ARN sb de polarité positive, code 3 protéines structurales (capside, membrane et enveloppe) et 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Rodenhuis-Zybert et al., 2010) (Bhatt et al., 2021). Cet arbovirus, transmis par plusieurs moustiques de la famille *Aedes* (Gubler, 2011), existe sous 4 sérotypes antigéniquement différents : DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4 (Islam et al., 2020). Le sérotype 2 de ce virus est le plus représenté dans les zones endémiques (20,7%) (Jing & Yang, 2017; Khan et al., 2020, p. 202) . Le DENV est aujourd'hui un problème de santé publique car il est endémique dans plus de 100 pays à travers le monde et est responsable d'environ 20 000 décès par an (Bhatt et al., 2021). La plupart des cas d'infections par le DENV sont asymptomatiques ou aboutissent à des symptômes modérés (fièvre Dengue). Cependant des complications sévères peuvent être observées comme des fièvres hémorragiques ou des *dengue*

shock syndrome (DSS) caractérisés par des anomalies de la coagulation, menant à un choc hypovolémique et une défaillance multiviscérale (Pang et al., 2017). Ces complications (fièvres hémarragiques et DSS) sont majoritairement dues à une seconde infection hétérologue, c'est à dire une deuxième infection par un virus d'un sérotype différent de celui de la première infection (Guzman et al., 2013). Ce phénomène, nommé *antibody dependant enhancement* (ADE) est lié au fait que les anticorps, générés par la première infection, peuvent se lier au virus d'un autre sérotype mais ne peuvent pas le neutraliser, formant alors des complexes virus/anticorps. Ces complexes ont alors une grande facilité à entrer dans les phagocytes après reconnaissance du FcγR (Katzelnick et al., 2017). Les cibles principales du DENV sont la peau (cellules dendritiques, cellules de Langherans, monocytes) (Cerny et al., 2014), la rate (cellules endothéliales spléniques) (Jessie et al., 2004) et le foie (hépatocytes) (Couvelard et al., 1999; Jessie et al., 2004). En absence de vaccin prophylactique ayant une autorisation de mise sur le marché ou de traitement anti-viral efficace, il apparaît nécessaire de mieux comprendre le cycle du DENV ainsi que les mécanismes responsables de la physiopathologie associée.

2.2 Objectifs

Au-delà de son hépatotropisme naturel, le cycle du DENV présente des similitudes avec celui du VHC. Ainsi, la protéine de capside du DENV est partiellement localisée autour des GLs intracellulaires et cette étape semble primordiale pour la production de particules virales infectieuses (Samsa et al., 2009). Par ailleurs, l'exposition de cellules Huh7 à une hypoxie modérée (3% O_2) de 72 heures augmente considérablement la réplication du DENV (Frakolaki et al., 2018). Ces données nous ont conduits à nous intéresser au comportement du virus quand il évolue dans un environnement cellulaire

plus proche des conditions naturelles d'infection (pseudo-différenciation cellulaire et hypoxie physiologique - cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$).

2.3 Résultats principaux

Les travaux présentés ici sont des données préliminaires, qui nécessiteront d'être approfondies et confirmées.

Pour ce projet, le choix a été fait d'étudier le sérotype 2 du DENV (DENV-2), du fait de sa forte prévalence mondiale (20,7%) (Jing & Yang, 2017). Afin de réaliser les infection à MOI 2, les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ et Hu7.5^{Std} ont été mises en contact avec un inoculum de DENV-2 pendant 6 heures à 37°C puis lavées et ré-incubées avec du milieu de culture contenant ou non 1% de DMSO, sous 21% ou 1% d'O_2. par ce sérotype à une MOI 2 et les échantillons ont été récoltés 72 heures post-infection pour ces deux conditions.

L'analyse par immunofluorescence de l'expression de la protéine non structurale 3 (NS3) (**Figure 26A**) a montré que la proportion de cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ infectées était très nettement supérieure à celle des cellules témoins Huh7.5^{Std}, pourtant infectées à la même MOI de 2. La quantité de cette même protéine NS3, détectée par immunoblot avec le même anticorps, est également supérieure dans les cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ (**Figure 26B**). Par ailleurs, étant donnée la proportion de cellules infectées (**Figure 26A**), il était attendu que la révélation de la protéine NS3 par immunoblot en montre des quantités bien supérieures en cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ comparées à celles de la condition témoin. Nous n'avons pas pu expliquer ces différences entre les deux approches expérimentales. Aussi, ces expériences devront être reproduites.

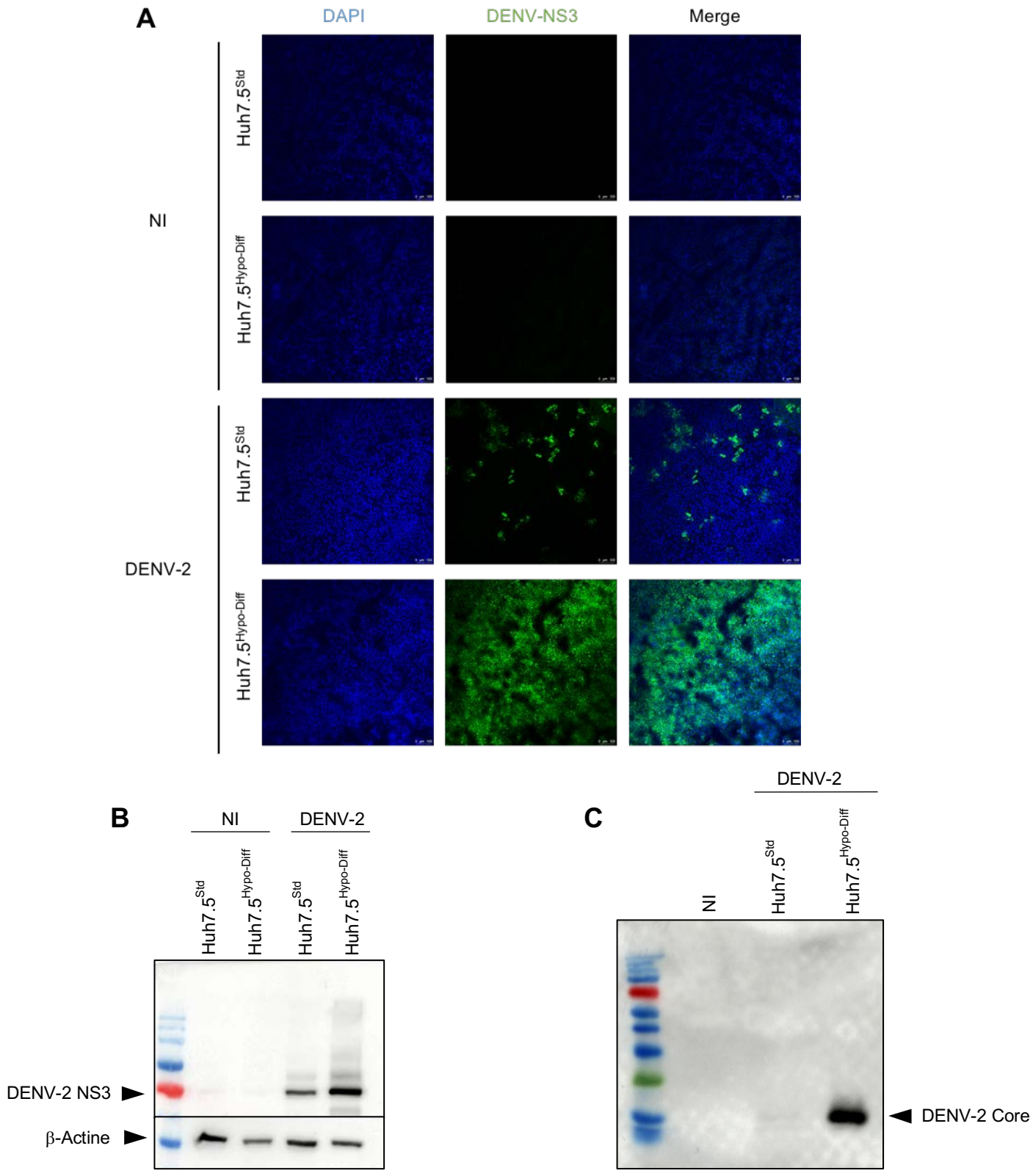


Figure 26. La combinaison de la différenciation cellulaire et de l'hypoxie prolongée favorise l'infection par le DENV. *Les cellules Huh7.5^{Std} et Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ ont été infectées par le DENV Sérotype 2 (DENV-2) à MOI = 2. Soixante-douze heures post-infection la protéine NS3 (DENV-2 NS3) a été révélée par immunofluorescence (**A**). Barre d'échelle = 100µm, et par immunoblot (**B**). La protéine de capside (DENV-2 core) a été détectée, par immunoblot dans le surnageant (**C**). NI = cellules non infectées.*

Le surnageant des cellules dans les deux conditions, infectées ou non, a été récolté et 8mL ont été déposés sur un coussin de sucrose 10%. Après ultracentrifugation, l'échantillon (20µg de protéines) a été résolue par SDS-PAGE, permettant la détection par immunoblot de la protéine de capside dans le surnageant de culture des cellules infectées (**Figure 26C**). Les résultats montrent clairement une bien meilleure capacité de production virale dans le milieu extracellulaire des cellules Huh7.5$^{Hypo\text{-}Diff}$ comparées aux cellules Huh7.5^{Std}.

Dans l'ensemble, ces résultats préliminaires suggèrent que la différenciation cellulaire, combinée à l'hypoxie prolongée favorise fortement l'infection et la production extracellulaire de particules virales néo-formées du virus de la Dengue par des cellules Huh7.5.

2.4 Discussion

Ces résultats, bien qu'encourageants, devront être reproduits et surtout complétés. En effet, le pouvoir infectieux du DENV n'a été ici évalué que sur des cultures combinant pseudo-différenciation et hypoxie. Or, nous savons que l'hypoxie physiologique est un facteur favorisant *per se* la réplication virale (Frakolaki et al., 2018). Il sera donc indispensable d'évaluer, avec nos cellules et dans nos conditions de culture, l'impact de l'hypoxie physiologique seule et de mesurer les différences d'efficacité d'infection avec des cellules exposées au DMSO seul et avec celles combinant les deux conditions expérimentales. Cette approche nous permettra de définitivement conclure sur l'éventuel avantage combinatoire (différenciation-hypoxie) sur le cycle intracellulaire du DENV.

En complément de ces expériences, le pouvoir infectieux des particules virales produites sera estimé afin d'évaluer l'impact fonctionnel des conditions de culture des cellules Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ sur les particules virales néo-formées. Il sera en outre réalisé ces mêmes expériences d'infection *in vitro* avec des DENV d'autres sérotypes que le 2 (sérotype 1, 3 et 4) afin d'exclure, ou non, l'hypothèse que les résultats obtenus sont une particularité sérotypique.

Enfin, comme pour le VHC, le modèle Huh7.5$^{Hypo-Diff}$ pourra être utilisé pour analyser finement le cycle intracellulaire du DENV, cycle qui n'est aujourd'hui que très peu décrit.

III. Étude 3 : Impact de l'hypoxie prolongée sur l'infection par le virus Zika

3.1 Situation du sujet avant la thèse

Le ZIKV est, comme le DENV, un arbovirus, appartenant à la famille des *Flaviviridae* et au genre Flavivirus. C'est en 1947 dans la forêt ougandaise Zika qu'il a été isolé initialement chez un singe macaque rhésus (Musso & Gubler, 2016). Il s'agit d'un virus enveloppé, composé d'un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 10kb, codant 3 protéines structurales (capside, membrane, enveloppe) et 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Javed et al., 2018). L'épidémiologie de ce virus est caractérisée par des épidémies massives, dont la première a été décrite en 2007 sur l'île de Yap et surtout, celle de 2015 au Brésil pour laquelle plus d'1,5 millions de cas avaient été rapportés. Il existe deux lignages de ce virus : africain et asiatique, c'est ce dernier qui est responsable des flambées épidémiques passées (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). À l'instar du DENV, les

moustiques de la famille des *Aedes* représentent la principale voie de transmission du ZIKV bien que d'autres voies de transmission inter-humaine, materno-fœtale ou par contact sexuel, aient été décrites (Kazmi et al., 2020). L'infection par le ZIKV est généralement asymptomatique et résolutive, les manifestations cliniques les plus courantes sont généralement celles assimilées à une grippe : fièvre, maux de tête mais également des rashs cutanés, des conjonctivites ou encore des douleurs rétro-orbitales. Certaines complications peuvent cependant être observées comme des syndromes de Guillain-Barré chez l'adulte et des microcéphalies chez le fœtus (Miner & Diamond, 2017). D'un point de vue physiopathologique, le ZIKV est responsable d'une mortalité cellulaire importante tant *in vivo* qu'*in vitro* (de Sousa et al., 2018; Faizan et al., 2016; Hammack et al., 2019). Le ZIKV infecte principalement le cerveau mais peut également infecter le foie. Du reste, il semble que l'infection par ce virus puisse persister dans divers fluides biologiques (sperme, salive, sécrétion lacrymales, salive) (Bhatnagar et al., 2017; Dang et al., 2016; Ma et al., 2016; MacNamara, 1954; *Presence of Zika Virus in Conjunctival Fluid*, 2016). Comme nous l'avons déjà décrit, ses organes cibles sont soumis à une oxygénation naturellement plus faible que celle atmosphérique (le cerveau par exemple évolue dans une oxygénation d'environ 4% O_2) (Carreau et al., 2011). L'impact de cette faible oxygénation naturelle sur le cycle intracellulaire du ZIKV et les conséquences cellulaires associées n'ont jamais été évalués.

3.2 Objectifs

Les objectifs de cette étude ont été de : a) déterminer l'impact de l'hypoxie prolongée en concentration physiologique sur l'infection *in vitro* par le ZIKV de lignage asiatique

de cellules Huh7.5 et ; b) d'évaluer les conséquences cellulaires de l'infection ZIKV sous hypoxie physiologique.

3.3 Principales approches expérimentales utilisées

Afin d'évaluer l'impact de l'hypoxie physiologique prolongée sur l'infection *in vitro* par le ZIKV, deux cultures distinctes de cellules Huh7.5 de 3 jours, l'une sous 1% d'O_2 (Huh7.5^{Hypo}), l'autre sous 21% (Huh7.7^{Std}), ont été infectées par le ZIKV à MOI 1 et maintenues en culture expérimentale (21% ou 1% O_2) pendant 48 heures. Dans un premier temps, l'efficacité de l'infection a été évaluée en détectant la protéine d'enveloppe par immunoblot dans les extraits cellulaires en déterminant les *median tissue culture infectious dose 50 %* (TCID50) extracellulaires et intracellulaires dans ces deux cultures.

Au cours de cette étude, deux constructions cellulaires distinctes, exprimant les sous-unités HIF-1α ou HIF-2α mutées sur certains sites d'hydroxylation après transduction par un lentivirus, ont aussi été employées. Les mutations introduites dans ces protéines exogènes doivent permettre aux protéines HIF-1α et HIF-2α d'être stabilisées sous normoxie et donc d'assurer leur rôle de facteur de transcription indépendamment de l'autre protéine HIF. Les séquences nucléotidiques mutées codant ces protéines ont été générées par mutagenèses dirigées des 3 sites d'hydroxylations présents dans les séquences protéiques (P420A, P564A et N803 pour HIF-1α et P450A, P531A et N851A pour HIF-2α) (voir section 2.2.1.1 pour avoir les détails des sites responsables de la stabilisation des HIFα). Ces sous-unités modifiées ne sont alors plus hydroxylées par les PHD et sont stabilisées ainsi en normoxie. Les constructions plasmidiques et lentivirales d'origine ont été générées par

le Dr. Hassan Dakik et le Dr. Frédéric Mazurier (CNRS, Equipe de recherche labélisée 7001, LNOx, Tours). Les lignées cellulaires ont été transduites et caractérisées par mes soins. Elles seront par la suite nommées Mut-HIF-1α pour les transductions avec HIF-1α muté et Mut-HIF-2α pour HIF-2α muté.

3.4 Résultats principaux

3.4.1 Impact de l'hypoxie prolongée sur l'infection du ZIKV

La détection par immunoblot de la protéine d'enveloppe du ZIKV (ZIKV E) dans les cellules cultivées en normoxie ou en hypoxie (**Figure 27A**) a révélé que les quantités de protéine E étaient réduites d'environ 80% dans les cellules Huh7.5^{Hypo} comparé à celles présentes en cellules Huh7.5^{Std}. La mesure des TCID50 intra et extracellulaires (**Figure 27B**), qui a montré une réduction de 2 log de ces valeurs vis-à-vis des cellules témoins, a confirmé que les niveaux d'infection étaient très nettement diminués en cellules cultivées sous hypoxie physiologique. Afin d'observer les conséquences cellulaires d'une infection par le ZIKV de cellules cultivées en hypoxie physiologique, une visualisation des cellules infectées a été réalisée au MET (**Figure 28**).

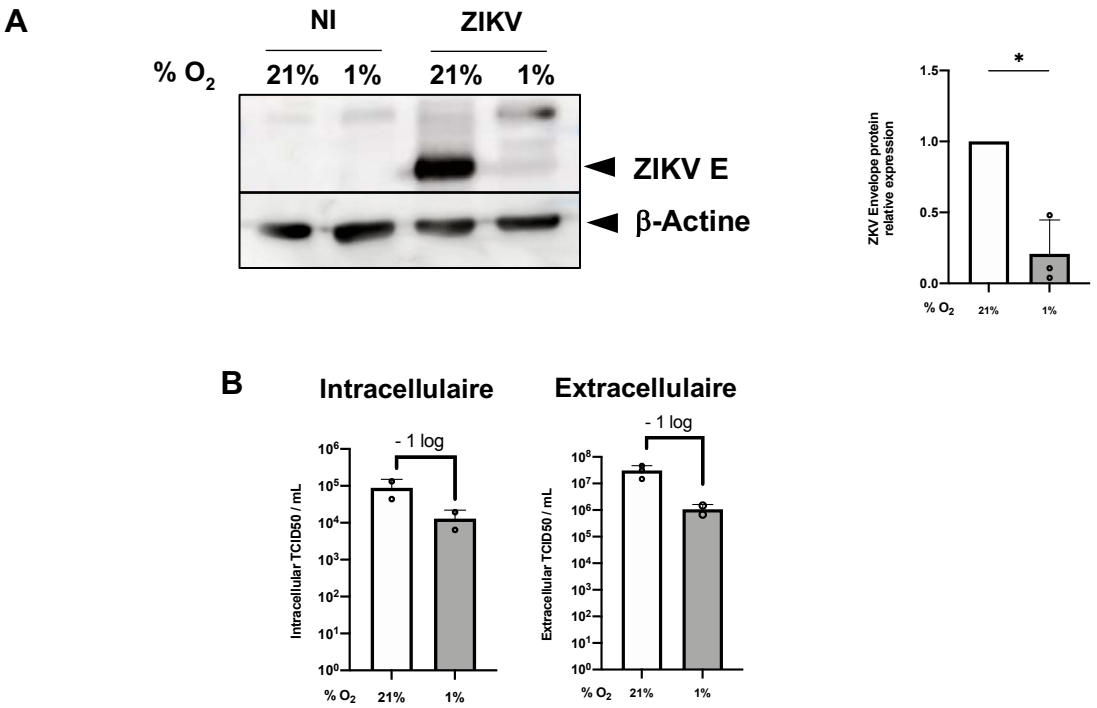


Figure 27. L'hypoxie physiologique prolongée limite l'infection des cellules Huh7.5 par le ZIKV. *(**A**) Détection par immunoblot de la protéine d'enveloppe du ZIKV (ZIKV E) et de la β-Actine. Une quantification densitométrique de l'intensité de la bande ZIKV E, normalisée par l'intensité de celle de la β-Actine, réalisée avec le logiciel ImageJ, est présentée à droite. NI = cellules non infectées ; ZIKV = culture de 5 jours infectée 48 h par le ZIKV MOI 1. N=3 (**B**) Quantification intracellulaire et extracellulaire par TCID50 des titres infectieux du ZIKV. Les résultats sont présentés en TCID50/mL. * p < 0,05 (Welch's t-test). N=2*

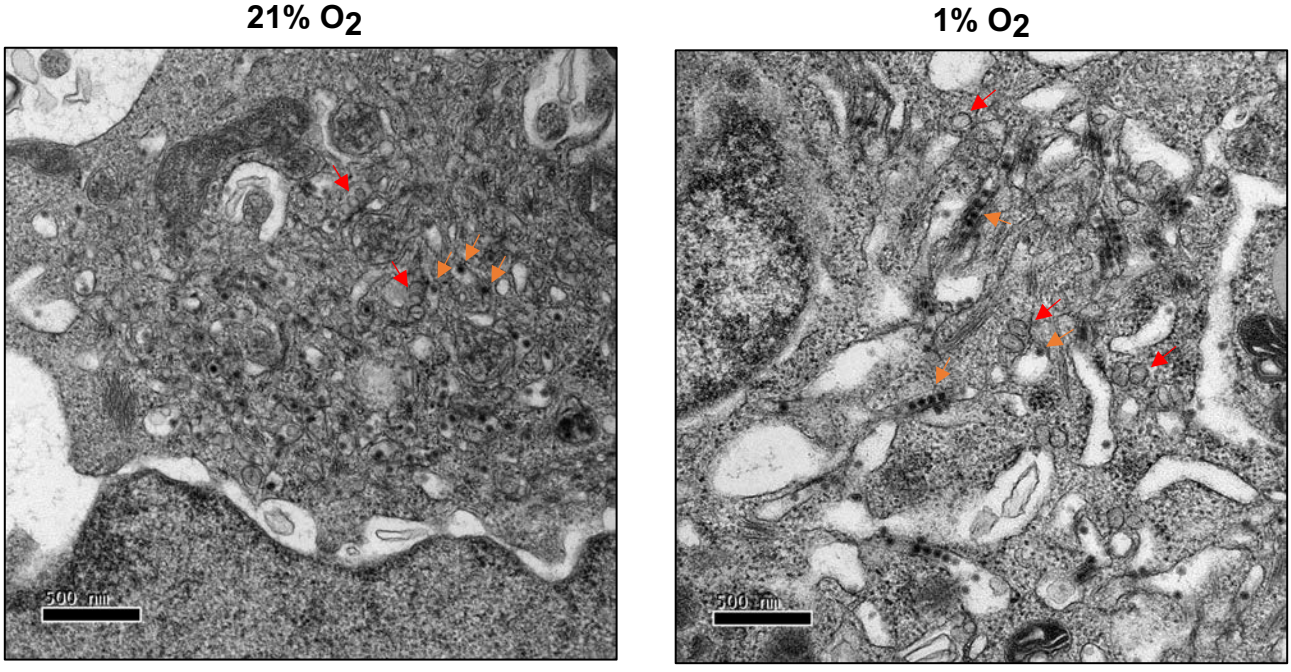


Figure 28. L'hypoxie physiologique prolongée n'impacte pas la formation des remaniements membranaires induits par le ZIKV en normoxie. *Observation au MET JEOL 14100 de cellules infectées par le ZIKV à MOI 10, cultivées en normoxie ou en hypoxie. Les flèches rouge indiquent les remaniements membranaires induits par le ZIKV (vésicules à simple membrane). Les flèches orange indiquent les particules virales. Barre d'échelle = 500nm et 200nm.*

Pour cette approche technique les cellules ont été infectées à MOI 10 afin d'optimiser le nombre de cellules infectées. L'observation des cellules cultivées dans les deux conditions au MET n'a pas permis de mettre en évidence de différences majeures dans les remaniements cellulaires consécutifs à une infection par le ZIKV. Ainsi dans les deux cultures, des vésicules à simple membrane (ou *vesicule packets*) ont été observées (flèches rouge) à proximité de particules virales (flèches orange). A partir de ces images, les cellules saines et celles qui présentaient des corps apoptotiques et une chromatine condensée, caractéristiques d'une figure apoptotique et celles qui présentaient une membrane plasmique altérée laissant s'échapper le contenu intracellulaire, propres à la nécrose cellulaire, ont été dénombrées dans chacune des deux conditions (**Figure 29**).

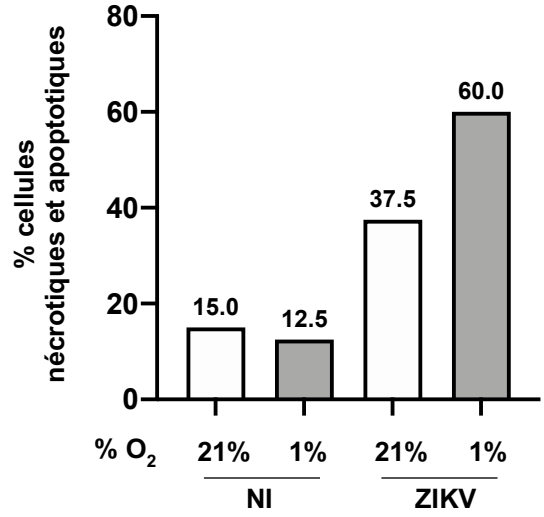


Figure 29. Le ZIKV induit une mortalité cellulaire accrue des cellules cultivées en hypoxie. *Les cellules infectées ou non, cultivées en normoxie ou en hypoxie ont été observées au MET JEOL 14100. Sur chaque grille de microscopie les cellules totales ainsi que les cellules nécrotiques et apoptotiques ont été dénombrées. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules mortes. N=178 cellules dénombrées. NI = cellules non infectées ; ZIKV = culture de 5 jours infectée 48 h par le ZIKV MOI 10*

Les résultats sont affichés en distinguant cellules vivantes et cellules mortes (indifféremment du type de mort cellulaire). Ainsi, le pourcentage de cellules mortes

était comparable dans les populations non infectées, en normoxie et en hypoxie (15% et 12,5%, respectivement - des taux élevés probablement en relation avec la technique de préparation des lames d'observation), confirmant ici que l'hypoxie prolongée n'est pas inductrice de mort des cellules Huh7.5. L'infection par ZIKV induisait une mort cellulaire quand les cellules étaient cultivées en normoxie (+ 22,5 %), ce qui confirme les données de la littérature (de Sousa et al., 2018; Faizan et al., 2016; Hammack et al., 2019). Cette mortalité induite par l'infection était néanmoins très largement supérieure en cellules Huh7.5^{Hypo} (+47,5 % par rapport aux cellules non infectées et +22,5 % de mortalité par rapport aux cellules Huh7.5^{Std} infectées). Du reste, les résultats obtenus pour les cellules infectées et cultivées en hypoxie étaient cohérents avec nos observations macroscopiques des flasques de culture où le tapis cellulaire était instable et recouvert d'un milieu de culture éclairci, témoin de son acidification. Ces observations sont compatibles avec une mortalité cellulaire importante. Bien sûr, ces résultats devront impérativement être confirmés par une quantification et une qualification plus précise de la mort cellulaire dans ces deux différentes conditions de culture. Un double marquage iodure de propidium / annexine V détecté au cytomètre en flux ou une détection par immunoblot de la caspase 3 activée est envisagée rapidement.

Néanmoins, ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que la mort cellulaire dépendante de ZIKV était à l'origine des faibles quantités intra et extracellulaires des marqueurs viraux en cellules Huh7.5^{Hypo}.

Ainsi, l'infection par ZIKV pourrait déstabiliser le métabolisme de l'hypoxie des cellules infectées, rendant alors impossible leur survie sous une faible concentration en oxygène. Les marqueurs de l'hypoxie, les facteurs de transcription HIFs, ont alors été analysés dans ces cellules.

3.4.2 Conséquences de l'infection par le ZIKV sur les cellules Huh7.5 cultivées en hypoxie

Des extraits protéiques de lysats nucléaires des cellules cultivées en normoxie et en hypoxie, infectées ou non par le ZIKV à MOI 1 ont été fragmentés par SDS-PAGE et les protéines HIF-1α et HIF-2α ont été recherchées (**Figure 30).** Dans les cellules cultivées en normoxie, comme attendu, les sous-unités α n'étaient pas ou très peu détectées car déstabilisées par le taux élevé d'oxygène. A l'inverse, dans les cellules cultivées sous 1% de O_2, l'expression intranucléaire des deux sous-unités était importante, le faible pourcentage en O_2 permettant leur stabilisation et leur importation nucléaire.

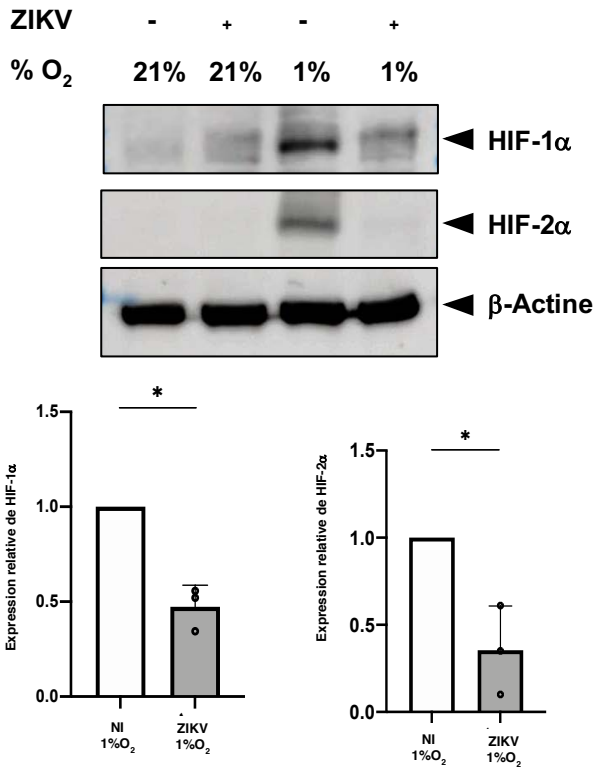


Figure 30. Le ZIKV diminue drastiquement l'expression des HIFα en hypoxie. *Détection par immunoblot des protéines HIF-1α, HIF-2α et β-Actine dans les extraits de protéines nucléaires. Une quantification densitométrique de l'intensité de la bande HIF-1α ou HIF-2α, normalisée par l'intensité de celle de la β-Actine, réalisée avec le logiciel ImageJ est présentée sous l'image du immunoblot. * p < 0,05 (Welch's t-test). N=3. NI = cellules non infectées ; ZIKV = culture de 5 jours infectée 48 h par le ZIKV MOI 1.*

Ces quantités étaient en revanche très fortement diminuées lorsque ces cellules étaient infectées par le ZIKV. Afin d'identifier les mécanismes sous-jacents à cette diminution d'expression des HIF-α, nous avons utilisé des lignées cellulaires Mut-HIF-1α et Mut-HIF-2α. Une lignée contrôle de transduction (Luc) a également été générée. Il s'agissait de cellules Huh7.5 transduites pour exprimer stablement la protéine luciférase. Ces cellules permettront de contrôler la spécificité des éventuels effets observés avec les cellules Mut-HIF-1α et Mut-HIF-2α, indépendamment d'un l'effet lié à la transduction lentivirale. Dans un premier temps, les cellules ont été caractérisées pour leur capacité à stabiliser le HIF-α exprimé en normoxie (**Figure 31**).

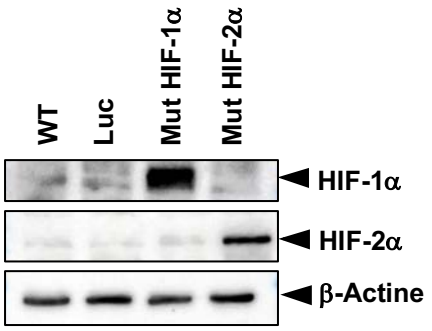


Figure 31. Contrôle de l'expression des protéines HIF-1α ou HIF-2α dans les lignées transduites *Mut-HIF-1α et Mut-HIF-2α* cultivées en normoxie. *Détection par immunoblot des protéines HIF-1α, HIF-2α et β-Actine dans les extraits de protéines nucléaires des différentes lignées. WT = cellules Huh7.5 non transduites. Luc = cellules témoins, exprimant stablement la luciférase. Mut-HIF-1α = cellules Huh7.5 exprimant stablement la protéine HIF-1α mutée sur les 3 sites d'hydroxylation. Mut-HIF-2α = cellules Huh7.5 exprimant stablement la protéine HIF-2α mutée sur les 3 sites d'hydroxylation.*

Les résultats indiquent que l'expression de HIF-1α et HIF-2α en normoxie dans chacune des deux lignées (et l'absence d'expression dans les cellules WT et Luc) était spécifique et que seule l'une ou l'autre des deux sous-unités HIFs-α était stabilisée dans la lignée cellulaire correspondante. Ces lignées validées ont alors servi à savoir si le ZIKV permettait une dégradation de ces HIFs indépendamment des sites d'hydroxylation. Ces différentes lignées ont alors été infectées par le ZIKV (MOI 1).

Quarante-huit heures post-infection les lysats protéiques ont alors été soumis à une détection des HIF-α (dans l'extrait nucléaire) et de la protéine ZIKV E (dans l'extrait cytoplasmique) par immunoblot (**Figure 32**).

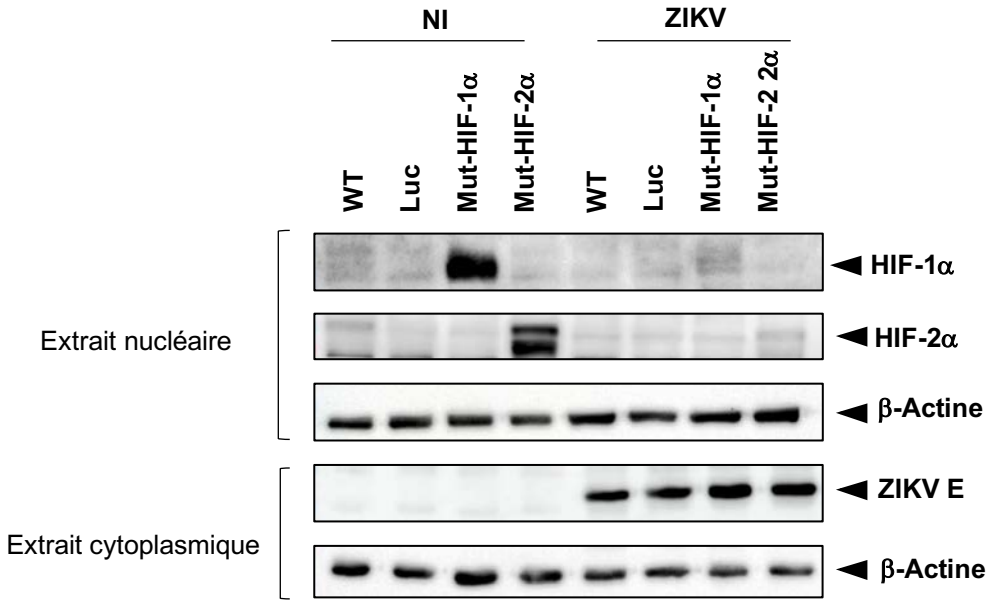


Figure 32. La dégradation viro-induite des HIFs est indépendante des trois sites d'hydroxylation. *Détection par immunoblot des protéines HIF-1α, HIF-2α, ZIKV E et β-Actine dans les extraits de protéines nucléaires et cytoplasmique des différentes lignées. WT = cellules Huh7.5 non transduites. Luc = cellules témoins, exprimant stablement la luciférase. Mut-HIF-1α = cellules Huh7.5 exprimant stablement la protéine HIF-1α mutée sur les 3 sites d'hydroxylation. Mut-HIF-2α = cellules Huh7.5 exprimant stablement la protéine HIF-2α mutée sur les 3 sites d'hydroxylation. NI = cellules non infectées ; ZIKV = culture de 5 jours infectée 48 h par le ZIKV MOI 1.*

Les données de cet immunoblot indiquent que, de manière similaire aux observations faites dans les cellules cultivées en hypoxie, l'expression des sous-unités HIF-1α et HIF-2α était drastiquement diminuée dans les cellules infectées par le ZIKV. Cette quasi-extinction de l'expression de ces protéines HIF-α n'était pas en lien avec leur accumulation cytoplasmique ou avec une diminution des quantités intracellulaires de leur ARNm (données non montrées). ZIKV induirait ainsi une dégradation des HIF-α indépendamment de la voie classique de régulation, PHD et VHL-dépendante.

Notons qu'en normoxie, la protéine virale ZIKV E n'était pas impactée par la dégradation des sous-unités α ; les titres viraux intra- et extracellulaires n'étaient eux aussi non impactés par cette dégradation (**Figure 32**).

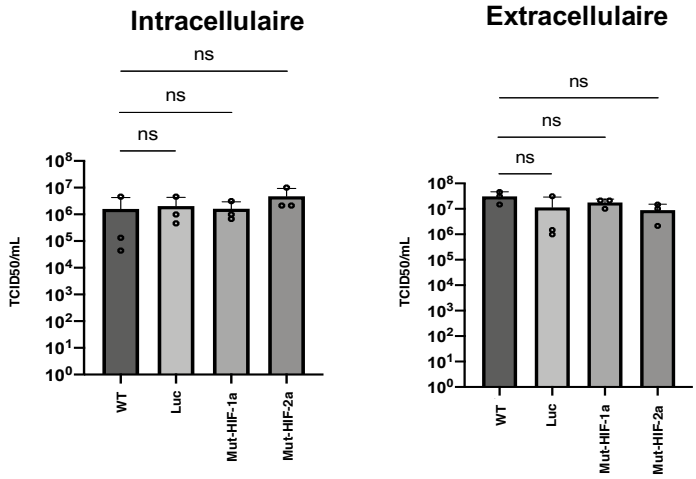


Figure 32. La dégradation viro-induite des HIFs n'est pas délétère pour l'infection par le ZIKV lorsque les cellules sont cultivées en normoxie. *Quantification intracellulaire et extracellulaire par TCID50 des titres infectieux du ZIKV. Les résultats sont présentés en TCID50/mL. WT = cellules Huh7.5 non transduites. Luc = cellules témoins, exprimant stablement la luciférase. Mut-HIF-1α = cellules Huh7.5 exprimant stablement la protéine HIF-1α mutée sur les 3 sites d'hydroxylation. Mut-HIF-2α = cellules Huh7.5 exprimant stablement la protéine HIF-2α mutée sur les 3 sites d'hydroxylation. ns = non significatif (Welch's t-test). N=3.*

Ces résultats tendent à confirmer l'hypothèse formulée précédemment à savoir que sous hypoxie physiologique et prolongée, la dégradation des sous-unités HIF-α par le ZIKV accentue fortement une mort cellulaire qui par ailleurs est observée dans une plus faible mesure dans des cultures de cellules Huh7.5 en normoxie. En effet, puisque les HIF-α contrôlent la survie cellulaire en activant des voies métaboliques adaptées à l'hypoxie, leur inhibition est dramatique pour la cellule. L'inhibition des HIF-α artificiellement stabilisés en normoxie est sans conséquence pour la cellule dont le métabolisme est adapté. Du reste, il a été montré, grâce à un modèle de souris nouveaux nés déficients pour l'expression de HIF-1α, que son absence en hypoxie induisait une forte apoptose (Bohuslavova et al., 2019). Le mécanisme d'inhibition de

la stabilité des HIF-α par le ZIKV est une voie indépendante des sites d'hydroxylation et de la dégradation *via* le protéasome de façon conventionnelle. La mécanistique de cette dégradation reste à explorer pour comprendre comment le ZIKV est un acteur de la mort cellulaire dans des cellules cultivées sous des concentrations physiologiques en oxygène.

3.5 Discussion

Contrairement au VHC ou au DENV, (Frakolaki et al., 2018; Vassilaki et al., 2013) la culture de ZIKV en hypoxie n'a jusqu'alors jamais été décrite. Ce virus infecte pourtant des organes qui évoluent naturellement dans un environnement pauvre en oxygène (4% O_2 pour le cerveau et entre 3% et 8% O_2 pour le foie) (Carreau et al., 2011). Cette étude avait donc pour but d'étudier l'impact de l'hypoxie physiologique prolongée sur l'infection par le ZIKV en cellules Huh7.5 ainsi que d'explorer les conséquences cellulaires potentiellement associées à un tel environnement de culture. De manière surprenante, notamment en lien avec les effets décrits pour le DENV, la culture de Huh7.5 durant 5 jours à 1% O_2 avait un impact négatif sur l'infection virale. En outre, nous avons observé dans ces cellules une surmortalité importante comparée aux cellules cultivées en normoxie. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec précaution, le comptage sur images de MET n'est pas la technique usuelle, et devra être confirmée par des approches de mesure quantitative de la mortalité cellulaire. Par ailleurs, cette étude a montré que le ZIKV induisait une dégradation des HIF-α, de manière indépendante de la voie classique de régulation dépendante des PHD et de la VHL.

En somme, nous avons émis l'hypothèse que la dégradation des HIFs induite par le ZIKV pourrait être responsable d'une mortalité cellulaire importante, elle-même à l'origine de la diminution des titres viraux.

Afin de valider cette hypothèse et d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents, il serait important de déterminer la nature de cette dégradation viro-induite. Un phénomène similaire a déjà été décrit pour un autre virus à ARN, le *mammalian orthoreovirus* (MRV) (Gupta-Saraf & Miller, 2014). Ce virus dégrade effectivement la sous-unité HIF-1α dans les cellules prostatiques cultivées en hypoxie, indépendamment de la voie de régulation dépendante des PHD. Cette dégradation a été montrée comme liée de la compétition de RACK1 et HSP90 pour la fixation sur le domaine PAS de HIF-1α (Voir section 2.2.2.2 pour les détails). Cette hypothèse est actuellement en phase de test au laboratoire, nous avons validé l'extinction spécifique de RACK1 (ARN interférence) dans les cellules cultivées en hypoxie et reçu un plasmide donné par le Dr. Cathy L.Miller (*Department of Veterinary Microbiology and Preventive Medecine, Iowa State University,* Etats-Unis) permettant l'expression de la sous-unité α dépourvue de son domaine PAS.

Pour compléter cette étude, il pourrait également être envisageable de déterminer la ou les protéines virales engagées dans ce phénomène. Différentes constructions sont actuellement en cours de développement afin d'exprimer plusieurs protéines virales tout en interdisant l'expression de certaines autres (par exemple uniquement les protéines structurales ou uniquement les protéines non structurales).

Enfin, l'utilisation de cellules hépatiques dans cette étude peut représenter une limite expérimentale puisque le ZIKV cible majoritairement le cerveau. Il serait opportun de confirmer nos résultats avec des cellules neurales. Après quelques tests avec des lignées de microglies ou de neuroblastomes, nous avons observé une forte

stabilisation des protéines HIF-α en normoxie, interdisant de fait leur utilisation pour notre étude.

Bien qu'encore préliminaire, cette étude apporte des informations nouvelles quant aux impacts cellulaires de l'infection par ZIKV en condition physiologique d'oxygénation. Ces travaux pourraient compléter les connaissances sur les mécanismes viro-induits menant aux complications cérébrales observées chez les enfants nés de mère infectée.

IV. Travaux publiés, en cours de publication ou en cours de préparation durant la thèse

Article publié :

Cochard J, Bull-Maurer A, Tauber C, Burlaud-Gaillard J, Mazurier F, Meunier J, *et al*. Differentiated Cells in Prolonged Hypoxia Produce Highly Infectious Native-Like Hepatitis C Virus Particles. Hepatology. 2021; 74; 627-640. hep.31788. https://doi.org/10.1002/hep.31788. PMID: 33665810.

Article soumis :

Hypoxia and HIF-1 trigger Marek's Disease Virus reactivation in lymphomas-derived latently-infected T lymphocytes. Corentin Mallet, **Jade Cochard**, Sébastien Leclercq, Laetitia Trapp-Fragnet[1], Philippe Chouteau, Caroline Denesvre*. Soumis à Journal of Virology le 18 Août 2021.

Articles en préparation :

Impact of prolonged hypoxia on Zika Virus infection and consequences on cellular disturbances. **Cochard J**, Burlaud-Gaillard J, Chollot M, Treguier Y, Dakik H, Mazurier F, Roingeard P, Chouteau P, Maquart M.

ApoE and Zika virus interactions in hepatic and neural cell lines. Treguier Y*, **Cochard J ***, Burlaud-Gaillard J, Meunier JC, Chouteau P, Roingeard P, Maquart M. * : co-premier auteur.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Depuis une quinzaine d'années, de multiples études ont permis de résoudre le cycle intracellulaire du VHC grâce à divers modèles *in vitro* fondés principalement sur l'utilisation conjointe de lignées cellulaires issues d'hépatocarcinomes et du clone infectieux JFH1 du VHC adaptés à ces cultures (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005). Ces avancées majeures sont à l'origine de l'emploi actuel d'antiviraux efficaces pour le traitement de l'hépatite C chronique.

Néanmoins, face notamment à l'émergence de résistances virales à ces traitements, face aussi à l'absence de traitements prophylactiques vaccinaux efficaces, la compréhension toujours plus fine du cycle virale demeure une nécessité. Or, les modèles cellulaires à disposition présentent des limites importantes, vis-à-vis notamment des étapes tardives du cycle viral, en étroite dépendance avec les caractéristiques lipidiques des hépatocytes dits natifs. Ces voies sont défectives dans les modèles cellulaires communément employés en virologie du VHC (Piver et al., 2017; Podevin et al., 2010).

Entre hépatocytes natifs et cellules isolées d'hépatocarcinomes, la différenciation et l'oxygénation des cellules sont parmi les différences les plus importantes. Les cellules d'hépatocarcinomes présentent des niveaux variables de dé-différenciation vis-à-vis de cellules primaires et ces cellules dé-différenciées sont communément cultivées sous des concentrations atmosphériques en oxygène alors que l'hépatocyte évolue naturellement sous une faible tension en oxygène dans l'environnement hépatique (Bauhofer et al., 2012; Carreau et al., 2011). Or, considérées individuellement, ces deux caractéristiques apparaissent comme des facteurs centraux de régulation du métabolisme des lipides (Steenbergen et al., 2013; Ujino et al., 2016).

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse fut de mettre en place et de caractériser un modèle de culture combinant à la fois la différenciation cellulaire et

l'hypoxie naturelle à partir de la lignée cellulaire de référence pour l'étude du VHC ; ce système devant alors servir de matrice à l'infection virale et, principalement, à l'étude des étapes tardives du cycle intracellulaire du VHC.

Ce modèle cellulaire expérimental active des voies lipidiques essentielles aux étapes tardives du cycle du VHC et les particules virales produites sont biochimiquement et structuralement similaires aux virus natifs présents en sérum infecté. Au-delà du fait que ce système cellulaire apparaît donc comme un outil simple, reproductible et relevant pour mimer fidèlement le cycle viral complet, il interroge du reste sur les mécanismes de la morphogenèse du VHC, jusqu'alors peu et peut être mal décrits. La co-localisation simultanée de trois acteurs majeurs de l'assemblage du VHC à la surface des gouttelettes lipidiques offre des données inédites et suggère que l'assemblage pourrait y débuter, conformément à certaines hypothèses déjà avancées. (Bartenschlager et al., 2011)

Compte tenu de ses caractéristiques, ce modèle d'étude peut donc être envisagé comme un système *ad hoc* pour les analyses fondamentales des mécanismes précis régissant le cycle du VHC. Il apparaît aussi, comme déjà évoqué, pouvant servir d'outil dans une stratégie vaccinale puisque les LVPs pseudo-natives produites pourraient servir de validation de l'efficacité de la réponse humorale neutralisante induite par un candidat vaccin.

Puisque les cellules utilisées sont d'origine hépatocytaire, les perspectives d'utilisation en virologie peuvent aussi s'élargir à d'autres virus hépatotropes. Ainsi, les données de la littérature suggèrent une forte homologie entre les cycles intracellulaires du VHC et celui du virus de la Dengue (DENV). En effet, tout comme le VHC, la protéine de capside du DENV est partiellement localisée autour des GLs (Faustino et al., 2014; Samsa et al., 2009). Au cours de travaux préliminaires, nous avons montré que les

conditions expérimentales de culture amélioraient très fortement le pouvoir infectieux *in vitro* du DENV, comparativement aux infections dites standards. Bien que ces expériences nécessitent d'être répétées et complétées de cultures témoins adéquates, ces données suggèrent néanmoins que le modèle pourrait combiner, comme observé pour le VHC, des conditions appropriées à l'étude fine d'une part du cycle intracellulaire du DENV mais aussi des conséquences cellulaires de cette infection.

L'une des conditions expérimentales pour laquelle il serait important de connaître précisément le comportement du DENV est celle où les cellules sont cultivées sous hypoxie physiologique, sans autre contrainte de culture. L'hypoxie physiologique seule est en effet un facteur qui favoriserait la réplication virale du DENV (Frakolaki et al., 2018). Elle semble d'ailleurs, plus largement, être un facteur de culture favorable aux virus de la famille des *Flaviviridae* (Frakolaki et al., 2018; Ujino et al., 2016; Vassilaki et al., 2013).

Le virus Zika (ZIKV) est un virus de cette famille des *Flaviviridae*. Jusqu'alors néanmoins, aucune donnée n'était disponible sur l'efficacité *in vitro* de son pouvoir infectieux, et sur l'impact cellulaire de ce cycle quand les conditions d'oxygénation des cultures sont respectueuses des taux physiologiques.

Puisque le ZIKV est aussi un virus hépatotrope, nous avons réalisé des expériences d'infection de la lignée hépatocytaire Huh7.5 sous hypoxie naturelle. Nos résultats suggèrent que l'infection de ces cellules induit une forte mortalité cellulaire en lien avec la dégradation des facteurs de transcription centraux du métabolisme hypoxique (HIF-1α et HIF-2α) par un ou des composants viraux. Si les mécanismes précis régissant cette dégradation doivent à présent être explorés, ces données originales *in vitro* doivent être mises en lien avec celles, déjà connues, établissant que l'infection en normoxie de cellules gliales par ZIKV entraine une mort cellulaire par apoptose (Souza

et al., 2016). Cette voie sera d'autant plus explorée dans notre modèle cellulaire qu'il a été établi que la déplétion des HIF-α sous hypoxie active cette voie (Bohuslavova et al., 2019). Enfin, comme pour le VHC et le DENV étudiés au cours de cette thèse, nous nous attacherons en outre, bien évidemment, à compléter ces données avec celles issues d'une culture combinant hypoxie naturelle et différenciation cellulaire compte tenu des avantages physiologiques qu'offre ce modèle de culture.

Au final, nous avons produit et caractérisé, au cours de cette thèse, un modèle cellulaire s'appuyant sur la combinaison de deux caractéristiques importantes des hépatocytes natifs, la différenciation cellulaire et l'hypoxie physiologique. Ce modèle respecte le cycle complet du VHC et pourrait s'avérer être un système précieux, tant pour les analyses fines des cycles d'autres virus hépatotropes que pour le développement d'outils à visée vaccinale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abe, M., Koga, H., Yoshida, T., Masuda, H., Iwamoto, H., Sakata, M., Hanada, S., Nakamura, T., Taniguchi, E., Kawaguchi, T., Yano, H., Torimura, T., Ueno, T., & Sata, M. (2012). Hepatitis C virus core protein upregulates the expression of vascular endothelial growth factor via the nuclear factor-κB/hypoxia-inducible factor-1α axis under hypoxic conditions: HCV core upregulates VEGF via the NF-κB/HIF-1α axis. *Hepatology Research*, *42*(6), 591–600. https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2011.00953.x

Aghemo, A., & Colombo, M. (2013). Hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C: From bench to bedside. *Seminars in Immunopathology*, *35*(1), 111–120. https://doi.org/10.1007/s00281-012-0330-z

Aicher, S., Kakkanas, A., Cohen, L., Blumen, B., Oprisan, G., Njouom, R., Meurs, E. F., Mavromara, P., & Martin, A. (2018). Differential regulation of the Wnt/β-catenin pathway by hepatitis C virus recombinants expressing core from various genotypes. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-29078-2

Alam, H., Weck, J., Maizels, E., Park, Y., Lee, E. J., Ashcroft, M., & Hunzicker-Dunn, M. (2009). Role of the Phosphatidylinositol-3-Kinase and Extracellular Regulated Kinase Pathways in the Induction of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Activity and the HIF-1 Target Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Granulosa Cells in Response to Follicle-Stimulating Hormone. *Endocrinology*, *150*(2), 915–928. https://doi.org/10.1210/en.2008-0850

Alavian, S. M., Hajarizadeh, B., Lankarani, K. B., Sharafi, H., Daryani, N. E., Merat, S., Mohraz, M., Mardani, M., Fattahi, M. R., Poustchi, H., Nikbin, M., Nabavi, M., Adibi, P., Ziaee, M., Behnava, B., Rezaee-Zavareh, M. S., Colombo, M., Massoumi, H., Bizri, A. R., … Malekzadeh, R. (2016). *Recommendations for the Clinical Management of Hepatitis C in Iran: A Consensus-Based National Guideline*. 15.

Alter, M. (2011). HCV Routes of Transmission: What Goes Around Comes Around. *Seminars in Liver Disease*, *31*(04), 340–346. https://doi.org/10.1055/s-0031-1297923
Alter, M. J. (2002). Prevention of spread of hepatitis C: Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*, *36*(5B), s93–s98. https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36389

Aly, H. H., Shimotohno, K., Hijikata, M., & Seya, T. (2012). In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle: Analysis of HCV infection. *Microbiology and Immunology*, *56*(1), 1–9. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00403.x

Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G., & Lotteau, V. (2002). Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *Journal of Virology*, *76*(14), 6919–6928. https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.6919-6928.2002

B

Bamberger, M. J., & Lane, M. D. (1990). Possible role of the Golgi apparatus in the assembly of very low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(7), 2390–2394. https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2390

Bantel, H., & Schulze-Osthoff, K. (2003). Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death & Differentiation*, *10*(S1), S48–S58. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401119
Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., & André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology*, *19*(2), 95–103. https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.005

Bartosch, B., Dubuisson, J., & Cosset, F.-L. (2003). Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *Journal of Experimental Medicine*, *197*(5), 633–642. https://doi.org/10.1084/jem.20021756

Bassendine, M. F., Sheridan, D. A., Bridge, S. H., Felmlee, D. J., & Neely, R. D. G. (2013). Lipids and HCV. *Seminars in Immunopathology*, *35*(1), 87–100. https://doi.org/10.1007/s00281-012-0356-2

Bauhofer, O., Ruggieri, A., Schmid, B., Schirmacher, P., & Bartenschlager, R. (2012). Persistence of HCV in Quiescent Hepatic Cells Under Conditions of an Interferon-Induced Antiviral Response. *Gastroenterology*, *143*(2), 429-438.e8. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.018

Begum, F., Das, S., Mukherjee, D., Mal, S., & Ray, U. (2019). Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. *Viruses*, *11*(12), 1136. https://doi.org/10.3390/v11121136

Benedicto, I., Gondar, V., Molina-Jiménez, F., García-Buey, L., López-Cabrera, M., Gastaminza, P., & Majano, P. L. (2015). Clathrin Mediates Infectious Hepatitis C Virus Particle Egress. *Journal of Virology*, *89*(8), 4180–4190. https://doi.org/10.1128/JVI.03620-14

Benga, W. J. A., Krieger, S. E., Dimitrova, M., Zeisel, M. B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T. F., & Schuster, C. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology*, *51*(1), 43–53. https://doi.org/10.1002/hep.23278

Bengrine, A. (2016). Modeling of HBV and HCV hepatitis with Hepatocyte-like cells. *Frontiers in Bioscience*, *8*(1), 97–105. https://doi.org/10.2741/s449

Benita, Y., Kikuchi, H., Smith, A. D., Zhang, M. Q., Chung, D. C., & Xavier, R. J. (2009). An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Research*, *37*(14), 4587–4602. https://doi.org/10.1093/nar/gkp425

Berger, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Terreux, R., Zayas, M., Paul, D., Harak, C., Hoppe, S., Gao, M., Penin, F., Lohmann, V., & Bartenschlager, R. (2014). Daclatasvir-Like Inhibitors of NS5A Block Early Biogenesis of Hepatitis C Virus–Induced Membranous Replication Factories, Independent of RNA Replication. *Gastroenterology*, *147*(5), 1094-1105.e25. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.019

Berger, K. L., Kelly, S. M., Jordan, T. X., Tartell, M. A., & Randall, G. (2011). Hepatitis C Virus Stimulates the Phosphatidylinositol 4-Kinase III Alpha-Dependent Phosphatidylinositol 4-Phosphate Production That Is Essential for Its Replication. *Journal of Virology*, *85*(17), 8870–8883. https://doi.org/10.1128/JVI.00059-11

Bersuker, K., Peterson, C. W. H., To, M., Sahl, S. J., Savikhin, V., Grossman, E. A., Nomura, D. K., & Olzmann, J. A. (2018). A Proximity Labeling Strategy Provides Insights into the Composition and Dynamics of Lipid Droplet Proteomes. *Developmental Cell*, *44*(1), 97-112.e7. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.11.020

Bhatnagar, J., Rabeneck, D. B., Martines, R. B., Reagan-Steiner, S., Ermias, Y., Estetter, L. B. C., Suzuki, T., Ritter, J., Keating, M. K., Hale, G., Gary, J., Muehlenbachs, A., Lambert, A., Lanciotti, R., Oduyebo, T., Meaney-Delman, D., Bolaños, F., Saad, E. A. P., Shieh, W.-J., & Zaki, S. R. (2017). Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(3), 405–414. https://doi.org/10.3201/eid2303.161499

Bhatt, P., Sabeena, S. P., Varma, M., & Arunkumar, G. (2021). Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Current Microbiology*, *78*(1), 17–32. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w

Blach, S., Zeuzem, S., Manns, M., Altraif, I., Duberg, A.-S., Muljono, D. H., Waked, I.,

Alavian, S. M., Lee, M.-H., Negro, F., Abaalkhail, F., Abdou, A., Abdulla, M., Rached, A. A., Aho, I., Akarca, U., Al Ghazzawi, I., Al Kaabi, S., Al Lawati, F., … Razavi, H. (2017). Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: A modelling study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, *2*(3), 161–176. https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30181-9

Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., & Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*, *80*(14), 6964–6972. https://doi.org/10.1128/JVI.00024-06

Bohuslavova, R., Cerychova, R., Papousek, F., Olejnickova, V., Bartos, M., Görlach, A., Kolar, F., Sedmera, D., Semenza, G. L., & Pavlinkova, G. (2019). HIF-1α is required for development of the sympathetic nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(27), 13414–13423. https://doi.org/10.1073/pnas.1903510116

Boulant, S., Targett-Adams, P., & McLauchlan, J. (2007). Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *Journal of General Virology*, *88*(8), 2204–2213. https://doi.org/10.1099/vir.0.82898-0

Bradley, D., McCaustland, K., Krawczynski, K., Spelbring, J., Humphey, C., & Cook, E. H. (1991). Hepatitis C virus: Buoyant density if the factor VIII-derived isolate in sucrose. *Journal of Medical Virology*, *34*(3), 206–208. https://doi.org/10.1002/jmv.1890340315

Bravo Zuñiga, J. I., Loza Munárriz, C., & López-Alcalde, J. (2016). Isolation as a strategy for controlling the transmission of hepatitis C virus (HCV) infection in haemodialysis units. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. https://doi.org/10.1002/14651858.CD006420.pub2

Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M., & Crotta, S. (2008). CD81 Is a Central Regulator of Cellular Events Required for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes. *Journal of Virology*, *82*(17), 8316–8329. https://doi.org/10.1128/JVI.00665-08

Brooks, G. A. (2018). The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metabolism*, *27*(4), 757–785. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008

Brouard, C., Le Strat, Y., Larsen, C., Jauffret-Roustide, M., Lot, F., & Pillonel, J. (2015). The Undiagnosed Chronically-Infected HCV Population in France. Implications for Expanded Testing Recommendations in 2014. *PLOS ONE*, *10*(5), e0126920. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126920

Bruno, S., Silini, E., Crosignani, A., Borzio, F., Leandro, G., Bono, F., Asti, M., Rossi, S., Larghi, A., Cerino, A., Podda, M., & Mondelli, M. U. (1997). Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: A prospective study. *Hepatology*, *25*(3), 754–758. https://doi.org/10.1002/hep.510250344

Burgess, J. W., Gould, D. R., & Marcel, Y. L. (1998). The HepG2 Extracellular Matrix Contains Separate Heparinase- and Lipid-releasable Pools of ApoE. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(10), 5645–5654. https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5645

C

Cao, L., Yu, B., Kong, D., Cong, Q., Yu, T., Chen, Z., Hu, Z., Chang, H., Zhong, J., Baker, D., & He, Y. (2019). Functional expression and characterization of the envelope glycoprotein E1E2 heterodimer of hepatitis C virus. *PLOS Pathogens*, *15*(5), e1007759. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007759

Carreau, A., Hafny-Rahbi, B. E., Matejuk, A., Grillon, C., & Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *15*(6), 1239–1253. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x

Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., & Poellinger, L. (2000). Redox-Regulated Recruitment of the Transcriptional Coactivators CREB-Binding Protein and SRC-1 to Hypoxia-Inducible Factor 1␣. *MOL. CELL. BIOL.*, *20*, 14.

Cerny, D., Haniffa, M., Shin, A., Bigliardi, P., Tan, B. K., Lee, B., Poidinger, M., Tan, E. Y., Ginhoux, F., & Fink, K. (2014). Selective Susceptibility of Human Skin Antigen Presenting Cells to Productive Dengue Virus Infection. *PLoS Pathogens*, *10*(12), e1004548. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004548

Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z., & Luo, G. (2007). Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Journal of Virology*, *81*(24), 13783–13793. https://doi.org/10.1128/JVI.01091-07

Chang, M.-L. (2007). Topological and evolutional relationships between HCV core protein and hepatic lipid vesicles: Studies in vitro and in conditionally transgenic mice. *World Journal of Gastroenterology*, *13*(25), 3472. https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i25.3472

Cheung, W. M. W., Ng, W. W., & Kung, A. W. C. (2006). Dimethyl sulfoxide as an inducer of differentiation in preosteoblast MC3T3-E1 cells. *FEBS Letters*, *580*(1), 121–126. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.062

Childs, K., Davis, C., Cannon, M., Montague, S., Filipe, A., Tong, L., Simmonds, P., Smith, D., Thomson, E. C., Dusheiko, G., & Agarwal, K. (2019). Suboptimal SVR rates in African patients with atypical genotype 1 subtypes: Implications for global elimination of hepatitis C. *Journal of Hepatology*, *71*(6), 1099–1105. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.07.025

Choudhary, V., Ojha, N., Golden, A., & Prinz, W. A. (2015). A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *Journal of Cell Biology*, *211*(2), 261–271. https://doi.org/10.1083/jcb.201505067

Clausen, L. N., Weis, N., Astvad, K., Schønning, K., Fenger, M., Krarup, H., Bukh, J., & Benfield, T. (2011). Interleukin-28B polymorphisms are associated with hepatitis C virus clearance and viral load in a HIV-1-infected cohort: *IL28B polymorphism and hepatitis C outcome*. *Journal of Viral Hepatitis*, *18*(4), e66–e74. https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01392.x

Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G.-W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Maxwell, P. H. (2000). Hypoxia Inducible Factor-α Binding and Ubiquitylation by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(33), 25733–25741. https://doi.org/10.1074/jbc.M002740200

Coenen, M., Nischalke, H. D., Krämer, B., Langhans, B., Glässner, A., Schulte, D., Körner, C., Sauerbruch, T., Nattermann, J., & Spengler, U. (2011). Hepatitis C virus core protein induces fibrogenic actions of hepatic stellate cells via toll-like receptor 2. *Laboratory Investigation*, *91*(9), 1375–1382. https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.78
Conde, I., Vinaixa, C., & Berenguer, M. (2017). Hepatitis C-related cirrhosis. Current status. *Medicina Clínica (English Edition)*, *148*(2), 78–85. https://doi.org/10.1016/j.medcle.2016.09.035

Convery, O., Gargan, S., Kickham, M., Schroder, M., O'Farrelly, C., & Stevenson, N. J. (2019). The hepatitis C virus (HCV) protein, p7, suppresses inflammatory responses to tumor necrosis factor (TNF)- *α via* signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and extracellular signal-regulated kinase (ERK)–mediated induction of suppressor of cytokine signaling (SOCS)3. *The FASEB Journal*, *33*(8), 8732–8744. https://doi.org/10.1096/fj.201800629RR

Cosset, F.-L., Mialon, C., Boson, B., Granier, C., & Denolly, S. (2020). HCV Interplay with Lipoproteins: Inside or Outside the Cells? *Viruses*, *12*(4), 434. https://doi.org/10.3390/v12040434

Couvelard, A., Marianneau, P., Bedel, C., Drouet, M.-T., Vachon, F., Hénin, D., & Deubel, V. (1999). Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: Demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Human Pathology*, *30*(9), 1106–1110. https://doi.org/10.1016/S0046-8177(99)90230-7

D

Dang, J., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V. S., Eroshkin, A. M., & Rana, T. M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, *19*(2), 258–265. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014

de Sousa, J. R., Azevedo, R. S. S., Martins Filho, A. J., Araujo, M. T. F., Moutinho, E. R. C., Baldez Vasconcelos, B. C., Cruz, A. C. R., Oliveira, C. S., Martins, L. C., Baldez Vasconcelos, B. H., Casseb, L. M. N., Chiang, J. O., Quaresma, J. A. S., & Vasconcelos, P. F. C. (2018). Correlation between Apoptosis and in Situ Immune Response in Fatal Cases of Microcephaly Caused by Zika Virus. *The American Journal of Pathology*, *188*(11), 2644–2652. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.07.009

Dengler, V. L., Galbraith, M. D., & Espinosa, J. M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *49*(1), 1–15. https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205

Denolly, S., Granier, C., Fontaine, N., Pozzetto, B., Bourlet, T., Guérin, M., & Cosset, F.-L. (2019). A serum protein factor mediates maturation and apoB-association of HCV particles in the extracellular milieu. *Journal of Hepatology*, *70*(4), 626–638. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.11.033

Denolly, S., Mialon, C., Bourlet, T., Amirache, F., Penin, F., Lindenbach, B., Boson, B., & Cosset, F.-L. (2017). The amino-terminus of the hepatitis C virus (HCV) p7 viroporin and its cleavage from glycoprotein E2-p7 precursor determine specific infectivity and secretion levels of HCV particle types. *PLOS Pathogens*, *13*(12), e1006774. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006774

Dhingra, S. (2016). Liver pathology of hepatitis C, beyond grading and staging of the disease. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(4), 1357. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i4.1357

Diaz, O. (2006). Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *Journal of General Virology*, *87*(10), 2983–2991.

https://doi.org/10.1099/vir.0.82033-0

DiStefano, M. T., Danai, L. V., Roth Flach, R. J., Chawla, A., Pedersen, D. J., Guilherme, A., & Czech, M. P. (2015). The Lipid Droplet Protein Hypoxia-inducible Gene 2 Promotes Hepatic Triglyceride Deposition by Inhibiting Lipolysis. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(24), 15175–15184. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.650184

Drummer, H. E. (2014). Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies. *Frontiers in Microbiology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00329

Duan, C. (2016). Hypoxia-inducible factor 3 biology: Complexities and emerging themes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *310*(4), C260–C269. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2015

Dubuisson, J., & Cosset, F.-L. (2014). Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *Journal of Hepatology*, *61*(1), S3–S13. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.031

E

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., & Bienz, K. (2002). Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology*, *76*(12), 5974–5984. https://doi.org/10.1128/JVI.76.12.5974-5984.2002

Einav, S., Gerber, D., Bryson, P. D., Sklan, E. H., Elazar, M., Maerkl, S. J., Glenn, J. S., & Quake, S. R. (2008). Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nature Biotechnology*, *26*(9), 1019–1027. https://doi.org/10.1038/nbt.1490

El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, *142*(6), 1264-1273.e1. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061

Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., & Fujii-Kuriyama, Y. (1999). *Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1α in response to hypoxia: Their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300*. 10.

Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France

métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides. (2019). 372.

Evans, M. J., Hatziioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., & Rice, C. M. (2007). *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry*. *446*, 5.

Evans, M. J., Rice, C. M., & Goff, S. P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(35), 13038–13043. https://doi.org/10.1073/pnas.0405152101

F

Faizan, M. I., Abdullah, M., Ali, S., Naqvi, I. H., Ahmed, A., & Parveen, S. (2016). Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. *Intervirology*, *59*(3), 152–158. https://doi.org/10.1159/000452950

Faustino, A. F., Carvalho, F. A., Martins, I. C., Castanho, M. A. R. B., Mohana-Borges, R., Almeida, F. C. L., Da Poian, A. T., & Santos, N. C. (2014). Dengue virus capsid protein interacts specifically with very low-density lipoproteins. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *10*(1), 247–255. https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.06.004

Fauvelle, C., Felmlee, D. J., Crouchet, E., Lee, J., Heydmann, L., Lefèvre, M., Magri, A., Hiet, M.-S., Fofana, I., Habersetzer, F., Foung, S. K. H., Milne, R., Patel, A. H., Vercauteren, K., Meuleman, P., Zeisel, M. B., Bartenschlager, R., Schuster, C., & Baumert, T. F. (2016). Apolipoprotein E Mediates Evasion From Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Gastroenterology*, *150*(1), 206-217.e4. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.014

Ferraris, P., Blanchard, E., & Roingeard, P. (2010). Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *Journal of General Virology*, *91*(9), 2230–2237. https://doi.org/10.1099/vir.0.022186-0

Fourati, S., Rodriguez, C., Hézode, C., Soulier, A., Ruiz, I., Poiteau, L., Chevaliez, S., & Pawlotsky, J. (2019). Frequent Antiviral Treatment Failures in Patients Infected With Hepatitis C Virus Genotype 4, Subtype 4r. *Hepatology*, *69*(2), 513–523. https://doi.org/10.1002/hep.30225

Frakolaki, E., Kaimou, P., Moraiti, M., Kalliampakou, K., Karampetsou, K., Dotsika, E., Liakos, P., Vassilacopoulou, D., Mavromara, P., Bartenschlager, R., & Vassilaki, N. (2018). The Role of Tissue Oxygen Tension in Dengue Virus Replication. *Cells*, *7*(12),

241. https://doi.org/10.3390/cells7120241

Freedman, H., Logan, M. R., Law, J. L. M., & Houghton, M. (2016). Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. *ACS Infectious Diseases*, *2*(11), 749–762. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00110

Fromentin, R., Majeau, N., Gagné, M.-E. L., Boivin, A., & Leclerc, D. (2008). *A method for in vitro assembly of HCV core protein and for screening of inhibitors*. 15.

Fujimoto, T., & Parton, R. G. (2011). Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(3), a004838–a004838. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004838

G

Galli, A., Scheel, T. K. H., Prentoe, J. C., Mikkelsen, L. S., Gottwein, J. M., & Bukh, J. (2013). Analysis of hepatitis C virus core/NS5A protein co-localization using novel cell culture systems expressing core-NS2 and NS5A of genotypes 1-7. *Journal of General Virology*, *94*(Pt_10), 2221–2235. https://doi.org/10.1099/vir.0.053868-0

Gamino, V., & Höfle, U. (2013). Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: A review. *Veterinary Research*, *44*(1), 39. https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-39

Gao, Q., Binns, D. D., Kinch, L. N., Grishin, N. V., Ortiz, N., Chen, X., & Goodman, J. M. (2017). Pet10p is a yeast perilipin that stabilizes lipid droplets and promotes their assembly. *Journal of Cell Biology*, *216*(10), 3199–3217. https://doi.org/10.1083/jcb.201610013

Garaigorta, U., & Chisari, F. V. (2009). Hepatitis C Virus Blocks Interferon Effector Function by Inducing Protein Kinase R Phosphorylation. *Cell Host & Microbe*, *6*(6), 513–522. https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.11.004

Gawlik, K., Baugh, J., Chatterji, U., Lim, P. J., Bobardt, M. D., & Gallay, P. A. (2014). HCV Core Residues Critical for Infectivity Are Also Involved in Core-NS5A Complex Formation. *PLoS ONE*, *9*(2), e88866. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088866

Gebhardt, R., Baldysiak-Figiel, A., Krügel, V., Ueberham, E., & Gaunitz, F. (2007). Hepatocellular expression of glutamine synthetase: An indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, *41*(4), 201–266. https://doi.org/10.1016/j.proghi.2006.12.001

Gerold, G., Moeller, R., & Pietschmann, T. (2020). Hepatitis C Virus Entry: Protein Interactions and Fusion Determinants Governing Productive Hepatocyte Invasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *10*(2), a036830. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036830

Giang, E., Dorner, M., Prentoe, J. C., Dreux, M., Evans, M. J., Bukh, J., Rice, C. M., Ploss, A., Burton, D. R., & Law, M. (2012). Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6205–6210. https://doi.org/10.1073/pnas.1114927109

Gimm, T., Wiese, M., Teschemacher, B., Deggerich, A., Schödel, J., Knaup, K. X., Hackenbeck, T., Hellerbrand, C., Amann, K., Wiesener, M. S., Höning, S., Eckardt, K.-U., & Warnecke, C. (2010). Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1. *The FASEB Journal*, *24*(11), 4443–4458. https://doi.org/10.1096/fj.10-159806

Glebe, D., Berting, A., Broehl, S., Naumann, H., Schuster, R., Fiedler, N., Tolle, T. K., Nitsche, S., Seifer, M., Gerlich, W. H., & Schaefer, S. (2001). Optimised Conditions for the Production of Hepatitis B Virus from Cell Culture. *Intervirology*, *44*(6), 370–378. https://doi.org/10.1159/000050074

Gomez, J., Martell, M., Quer, J., Cabot, B., & Esteban, J. I. (1999). Hepatitis C viral quasispecies. *Journal of Viral Hepatitis*, *6*(1), 3–16. https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.1999.t01-1-6120131.x

Gondeau, C., Briolotti, P., Razafy, F., Duret, C., Rubbo, P.-A., Helle, F., Rème, T., Ripault, M.-P., Ducos, J., Fabre, J.-M., Ramos, J., Pécheur, E.-I., Larrey, D., Maurel, P., & Daujat-Chavanieu, M. (2014). In vitro infection of primary human hepatocytes by HCV-positive sera: Insights on a highly relevant model. *Gut*, *63*(9), 1490–1500. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304623

Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., & Baker, S. C. (2002). RNA Replication of Mouse Hepatitis Virus Takes Place at Double-Membrane Vesicles. *Journal of Virology*, *76*(8), 3697–3708. https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.3697-3708.2002

Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (1993). Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: Determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *Journal of Virology*, *67*(5), 2832–2843. https://doi.org/10.1128/JVI.67.5.2832-2843.1993

Grebely, J., Raffa, J. D., Lai, C., Krajden, M., Conway, B., & Tyndall, M. W. (2007). Factors Associated with Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus among Illicit Drug

Users. *Canadian Journal of Gastroenterology*, *21*(7), 447–451. https://doi.org/10.1155/2007/796325

Gu, M., & Rice, C. M. (2010). Three conformational snapshots of the hepatitis C virus NS3 helicase reveal a ratchet translocation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(2), 521–528. https://doi.org/10.1073/pnas.0913380107
Gubler, D. J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health*, *39*(4SUPPLEMENT), S3–S11. https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05

Gupta-Saraf, P., & Miller, C. L. (2014). HIF-1α downregulation and apoptosis in hypoxic prostate tumor cells infected with oncolytic Mammalian Orthoreovirus. *Oncotarget*, *5*(2), 561–574. https://doi.org/10.18632/oncotarget.1767

Gusarova, V., Brodsky, J. L., & Fisher, E. A. (2003). Apolipoprotein B100 Exit from the Endoplasmic Reticulum (ER) Is COPII-dependent, and Its Lipidation to Very Low Density Lipoprotein Occurs Post-ER. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(48), 48051–48058. https://doi.org/10.1074/jbc.M306898200

Guzman, M. G., Alvarez, M., & Halstead, S. B. (2013). Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of Virology*, *158*(7), 1445–1459. https://doi.org/10.1007/s00705-013-1645-3

Gwak, G.-Y., Yoon, J.-H., Kim, K. M., Lee, H.-S., Chung, J. W., & Gores, G. J. (2005). Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. *Journal of Hepatology*, *42*(3), 358–364. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.11.020

H

Hamdane, N., Jühling, F., Crouchet, E., El Saghire, H., Thumann, C., Oudot, M. A., Bandiera, S., Saviano, A., Ponsolles, C., Roca Suarez, A. A., Li, S., Fujiwara, N., Ono, A., Davidson, I., Bardeesy, N., Schmidl, C., Bock, C., Schuster, C., Lupberger, J., … Baumert, T. F. (2019). HCV-Induced Epigenetic Changes Associated With Liver Cancer Risk Persist After Sustained Virologic Response. *Gastroenterology*. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.02.038

Hammack, C., Ogden, S. C., Madden, J. C., Medina, A., Xu, C., Phillips, E., Son, Y., Cone, A., Giovinazzi, S., Didier, R. A., Gilbert, D. M., Song, H., Ming, G., Wen, Z., Brinton, M. A., Gunjan, A., & Tang, H. (2019). Zika Virus Infection Induces DNA

Damage Response in Human Neural Progenitors That Enhances Viral Replication. *Journal of Virology*, *93*(20). https://doi.org/10.1128/JVI.00638-19

Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., & Imura, N. (2001). Expression and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-3α in Human Kidney: Suppression of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3α. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *287*(4), 808–813. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5659

Harris, H. J., Davis, C., Mullins, J. G. L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M. J., Mee, C. J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., Balfe, P., & McKeating, J. A. (2010). *Claudin Association with CD81 Defines Hepatitis C Virus Entry□S*. *285*(27), 11.
Hauri, A. M., Armstrong, G. L., & Hutin, Y. J. F. (2004). The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *International Journal of STD & AIDS*, *15*(1), 7–16. https://doi.org/10.1258/095646204322637182

He, Y., Staschke, K. A., & Tan, S.-L. (2006). *HCV NS5A: A Multifunctional Regulator of Cellular Pathways and Virus Replication*. 26.

Heim, M. H., Moradpour, D., & Blum, H. E. (1999). Expression of Hepatitis C Virus Proteins Inhibits Signal Transduction through the Jak-STAT Pathway. *Journal of Virology*, *73*(10), 8469–8475. https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8469-8475.1999

Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., Farese, R. V., & Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature Medicine*, *16*(11), 1295–1298. https://doi.org/10.1038/nm.2238

Higgins, J. A. (1988). Evidence that during very low density lipoprotein assembly in rat hepatocytes most of the triacylglycerol and phospholipid are packaged with apolipoprotein B in the Golgi complex. *FEBS Letters*, *232*(2), 405–408. https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80780-4

Hino, H., Tateno, C., Sato, H., Yamasaki, C., Katayama, S., Kohashi, T., Aratani, A., Asahara, T., Dohi, K., & Yoshizato, K. (1999). A Long-Term Culture of Human Hepatocytes Which Show a High Growth Potential and Express Their Differentiated Phenotypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *256*(1), 184–191. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0288

Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, Å., Gradin, K., Poellinger, L., & Påhlman, S. (2006). Recruitment of HIF-1α and HIF-2α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*, *10*(5), 413–423. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.026

Hossain, T., Riad, A., Siddiqi, S., Parthasarathy, S., & Siddiqi, S. A. (2014). Mature VLDL triggers the biogenesis of a distinct vesicle from the trans-Golgi network for its export to the plasma membrane. *Biochemical Journal*, *459*(1), 47–58. https://doi.org/10.1042/BJ20131215

Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(12), 7271–7276. https://doi.org/10.1073/pnas.0832180100

Hu, B., Xie, S., Hu, Y., Chen, W., Chen, X., Zheng, Y., & Wu, X. (2017). Hepatitis C virus NS4B protein induces epithelial-mesenchymal transition by upregulation of Snail. *Virology Journal*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/s12985-017-0737-1

Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., & Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(14), 5848–5853. https://doi.org/10.1073/pnas.0700760104

Huang, Z. H., Gu, D., & Mazzone, T. (2004). Oleic Acid Modulates the Post-translational Glycosylation of Macrophage ApoE to Increase Its Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(28), 29195–29201. https://doi.org/10.1074/jbc.M402631200

Hwang, L.-Y., Kramer, J. R., Troisi, C., Bull, L., Grimes, C. Z., Lyerla, R., & Alter, M. J. (2006). Relationship of cosmetic procedures and drug use to hepatitis C and hepatitis B virus infections in a low-risk population. *Hepatology*, *44*(2), 341–351. https://doi.org/10.1002/hep.21252

I

Ichai, P., & Samuel, D. (2019). Management of Fulminant Hepatitis B. *Current Infectious Disease Reports*, *21*(7), 25. https://doi.org/10.1007/s11908-019-0682-9

Illingworth, D. R. (1993). Lipoprotein Metabolism. *American Journal of Kidney Diseases*, *22*(1), 90–97. https://doi.org/10.1016/S0272-6386(12)70173-7

Islam, A., Abdullah, Mohd., Tazeen, A., Naqvi, I. H., Kazim, S. N., Ahmed, A., Alamery, S. F., Malik, A., & Parveen, S. (2020). Circulation of dengue virus serotypes in hyperendemic region of New Delhi, India during 2011–2017. *Journal of Infection and Public Health*, *13*(12), 1912–1919. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.10.009

J

Javed, F., Manzoor, K. N., Ali, M., Haq, I. U., Khan, A. A., Zaib, A., & Manzoor, S. (2018). Zika virus: What we need to know? *Journal of Basic Microbiology*, *58*(1), 3–16. https://doi.org/10.1002/jobm.201700398

Javed, F., & Manzoor, S. (2018). HCV non-structural NS4A protein of genotype 3a induces mitochondria mediated death by activating Bax and the caspase cascade. *Microbial Pathogenesis*, *124*, 346–355. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.065

Jessie, K., Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K., & Wong, K. T. (2004). Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. *The Journal of Infectious Diseases*, *189*(8), 1411–1418. https://doi.org/10.1086/383043

Jiang, J., & Luo, G. (2009). Apolipoprotein E but Not B Is Required for the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *Journal of Virology*, *83*(24), 12680–12691. https://doi.org/10.1128/JVI.01476-09

Jing, C., & Yang, G. (2017). Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 11.

Jungermann, K., & Kietzmann, T. (2000). Oxygen: Modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology*, *31*(2), 255–260. https://doi.org/10.1002/hep.510310201

K

Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Molecular Cell*, *30*(4), 393–402. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009

Kalousi, A., Mylonis, I., Politou, A. S., Chachami, G., Paraskeva, E., & Simos, G. (2010). Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of Cell Science*, *123*(17), 2976–2986. https://doi.org/10.1242/jcs.068122

Kandangwa, M., & Liu, Q. (2019). HCV NS5A hyperphosphorylation is involved in viral translation modulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,

520(1), 192–197. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.105

Kao, C. C., Yi, G., & Huang, H.-C. (2016). The core of hepatitis C virus pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, *17*, 66–73. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.009

Kato, N., Mori, K., Abe, K., Dansako, H., Kuroki, M., Ariumi, Y., Wakita, T., & Ikeda, M. (2009). Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Research*, *146*(1–2), 41–50. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.08.006

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., & Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, *125*(6), 1808–1817. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.09.023

Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, *358*(6365), 929–932. https://doi.org/10.1126/science.aan6836

Kaul, A., Woerz, I., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., & Bartenschlager, R. (2007). Cell Culture Adaptation of Hepatitis C Virus and In Vivo Viability of an Adapted Variant. *Journal of Virology*, *81*(23), 13168–13179. https://doi.org/10.1128/JVI.01362-07

Kazmi, S. S., Ali, W., Bibi, N., & Nouroz, F. (2020). A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, *27*(1). https://doi.org/10.1186/s40709-020-00115-4

Keith, B., Adelman, D. M., & Simon, M. C. (2001). Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(12), 6692–6697. https://doi.org/10.1073/pnas.121494298

Khan, N. U., Danish, L., Khan, H. U., Shah, M., Ismail, M., Ali, I., Petruzziello, A., Sabatino, R., Guzzo, A., Botti, G., & Iqbal, A. (2020). Prevalence of dengue virus serotypes in the 2017 outbreak in Peshawar, KP, Pakistan. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *34*(9). https://doi.org/10.1002/jcla.23371

Khetani, S. R., & Bhatia, S. N. (2008). Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nature Biotechnology*, *26*(1), 120–126. https://doi.org/10.1038/nbt1361

Kietzmann, T., Dimova, E., Flügel, D., & Scharf, J.-G. (2006). Oxygen: Modulator of Physiological and Pathophysiological Processes in the Liver. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, *44*(01), 67–76. https://doi.org/10.1055/s-2005-858987

Kockx, M., Traini, M., & Kritharides, L. (2018). Cell-specific production, secretion, and function of apolipoprotein E. *Journal of Molecular Medicine*, *96*(5), 361–371. https://doi.org/10.1007/s00109-018-1632-y

Kushima, Y., Wakita, T., & Hijikata, M. (2010). A Disulfide-Bonded Dimer of the Core Protein of Hepatitis C Virus Is Important for Virus-Like Particle Production. *Journal of Virology*, *84*(18), 9118–9127. https://doi.org/10.1128/JVI.00402-10

L

Lagaye, S., Shen, H., Saunier, B., Nascimbeni, M., Gaston, J., Bourdoncle, P., Hannoun, L., Massault, P.-P., Vallet-Pichard, A., Mallet, V., & Pol, S. (2012). Efficient replication of primary or culture hepatitis C virus isolates in human liver slices: A relevant *ex vivo* model of liver infection. *Hepatology*, *56*(3), 861–872. https://doi.org/10.1002/hep.25738

Lan, K.-H., Sheu, M.-L., Hwang, S.-J., Yen, S.-H., Chen, S.-Y., Wu, J.-C., Wang, Y.-J., Kato, N., Omata, M., Chang, F.-Y., & Lee, S.-D. (2002). HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene*, *21*(31), 4801–4811. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205589

Lavie, M., & Goffard, A. (2007). *Assembly of a Functional HCV Glycoprotein Heterodimer*. 17.

Lee, H.-R., Lee, G. Y., You, D.-G., Kim, H. K., & Yoo, Y. D. (2020). Hepatitis C Virus p7 Induces Membrane Permeabilization by Interacting with Phosphatidylserine. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 897. https://doi.org/10.3390/ijms21030897

Lee, J.-Y., Acosta, E. G., Stoeck, I. K., Long, G., Hiet, M.-S., Mueller, B., Fackler, O. T., Kallis, S., & Bartenschlager, R. (2014). Apolipoprotein E Likely Contributes to a Maturation Step of Infectious Hepatitis C Virus Particles and Interacts with Viral Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology*, *88*(21), 12422–12437. https://doi.org/10.1128/JVI.01660-14

Leon, L., Kasereka, S., Barin, F., Larsen, C., Weill-Barillet, L., Pascal, X., Chevaliez, S., Pillonel, J., Jauffret-Roustide, M., & Le Strat, Y. (2017). Age- and time-dependent prevalence and incidence of hepatitis C virus infection in drug users in France, 2004–2011: Model-based estimation from two national cross-sectional serosurveys. *Epidemiology and Infection*, *145*(5), 895–907.

https://doi.org/10.1017/S0950268816002934

Li, G., & De Clercq, E. (2017). Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral Research*, *142*, 83–122. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.02.014

Li, Q., Sodroski, C., Lowey, B., Schweitzer, C. J., Cha, H., Zhang, F., & Liang, T. J. (2016). Hepatitis C virus depends on E-cadherin as an entry factor and regulates its expression in epithelial-to-mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(27), 7620–7625. https://doi.org/10.1073/pnas.1602701113

Li, X.-D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G., & Chen, Z. J. (2005). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(49), 17717–17722. https://doi.org/10.1073/pnas.0508531102

Liang, Y., Cao, X., Ding, Q., Zhao, Y., He, Z., & Zhong, J. (2018). Hepatitis C virus NS4B induces the degradation of TRIF to inhibit TLR3-mediated interferon signaling pathway. *PLOS Pathogens*, *14*(5), e1007075. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007075

Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., & Rice, C. M. (2005). *Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture*. *309*, 5.

Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(10), 688–700. https://doi.org/10.1038/nrmicro3098

Liu, Y. V., & Semenza, G. L. (2007). RACK1 vs. HSP90: Competition for HIF-1α Degradation vs. Stabilization. *Cell Cycle*, *6*(6), 656–659. https://doi.org/10.4161/cc.6.6.3981

Lohmann, V. (1999). Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science*, *285*(5424), 110–113. https://doi.org/10.1126/science.285.5424.110

Lopez Angel, C. J., Pham, E. A., Du, H., Vallania, F., Fram, B. J., Perez, K., Nguyen, T., Rosenberg-Hasson, Y., Ahmed, A., Dekker, C. L., Grant, P. M., Khatri, P., Maecker, H. T., Glenn, J. S., Davis, M. M., & Furman, D. (2021). Signatures of immune dysfunction in HIV and HCV infection share features with chronic inflammation in aging and persist after viral reduction or elimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(14), e2022928118. https://doi.org/10.1073/pnas.2022928118

Lukens, J. R., Cruise, M. W., Lassen, M. G., & Hahn, Y. S. (2008). Blockade of PD-1/B7-H1 Interaction Restores Effector CD8 + T Cell Responses in a Hepatitis C Virus Core Murine Model. *The Journal of Immunology*, *180*(7), 4875–4884. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4875

M

Ma, W., Li, S., Ma, S., Jia, L., Zhang, F., Zhang, Y., Zhang, J., Wong, G., Zhang, S., Lu, X., Liu, M., Yan, J., Li, W., Qin, C., Han, D., Qin, C., Wang, N., Li, X., & Gao, G. F. (2016). Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell*, *167*(6), 1511-1524.e10. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.016

MacNamara, F. N. (1954). Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *48*(2), 139–145. https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1

Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C., & Weisgraber, K. H. (1984). Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research*, *25*(12), 1277–1294. https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34443-6

Mahmoudvand, S., Shokri, S., Taherkhani, R., & Farshadpour, F. (2019). Hepatitis C virus core protein modulates several signaling pathways involved in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, *25*(1), 42–58. https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i1.42

Mahon, P. C., Hirota, K., & Semenza, G. L. (2001). *FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1⎵ and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity*. 12.

Majeau, N., Gagné, V., Boivin, A., Bolduc, M., Majeau, J.-A., Ouellet, D., & Leclerc, D. (2004). The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. *Journal of General Virology*, *85*(4), 971–981. https://doi.org/10.1099/vir.0.79775-0

Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Molecular Cell*, *40*(2), 294–309. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.022

Mankouri, J., Walter, C., Stewart, H., Bentham, M., Park, W. S., Heo, W. D., Fukuda, M., Griffin, S., & Harris, M. (2016). Release of Infectious Hepatitis C Virus from Huh7 Cells Occurs via a *trans* -Golgi Network-to-Endosome Pathway Independent of Very-

Low-Density Lipoprotein Secretion. *Journal of Virology*, *90*(16), 7159–7170. https://doi.org/10.1128/JVI.00826-16

Manns, M. P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J.-M., Razavi, H., Terrault, N., & Younossi, Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1). https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.6

Marks, G., Crepaz, N., & Janssen, R. S. (2006). Estimating sexual transmission of HIV from persons aware and unaware that they are infected with the virus in the USA. *AIDS*, *20*(10), 1447–1450. https://doi.org/10.1097/01.aids.0000233579.79714.8d

Martin, A. S., Castaneda Patlan, M. C., & Robles Flores, M. (2017). The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Cancer Resistance. *Journal of Cell Signaling*, *02*(03). https://doi.org/10.4172/2576-1471.1000154

Martins, A. S., Carvalho, F. A., Faustino, A. F., Martins, I. C., & Santos, N. C. (2019). West Nile Virus Capsid Protein Interacts With Biologically Relevant Host Lipid Systems. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00008

Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., & Suzuki, T. (2008). Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. *Journal of Virology*, *82*(16), 7964–7976. https://doi.org/10.1128/JVI.00826-08

Mateu, G., Donis, R. O., Wakita, T., Bukh, J., & Grakoui, A. (2008). Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology*, *376*(2), 397–407. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.03.027

McLauchlan. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: A structural protein that modulates cellular processes. *Journal of Viral Hepatitis*, *7*(1), 2–14. https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2000.00201.x

McLauchlan, J. (2009). Hepatitis C virus: Viral proteins on the move. *Biochemical Society Transactions*, *37*(5), 986–990. https://doi.org/10.1042/BST0370986

Mee, C. J., Harris, H. J., Farquhar, M. J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van IJzendoorn, S. C. D., Balfe, P., & McKeating, J. A. (2009). Polarization Restricts Hepatitis C Virus Entry into HepG2 Hepatoma Cells. *Journal of Virology*, *83*(12), 6211–6221. https://doi.org/10.1128/JVI.00246-09

Merz, A., Long, G., Hiet, M.-S., Brügger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F.,

Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and Morphological Properties of Hepatitis C Virus Particles and Determination of Their Lipidome. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(4), 3018–3032. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.175018

Messina, J. P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G. S., Pybus, O. G., & Barnes, E. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, *61*(1), 77–87. https://doi.org/10.1002/hep.27259

Miao, Z., Xie, Z., Miao, J., Ran, J., Feng, Y., & Xia, X. (2017). *Regulated Entry of Hepatitis C Virus into Hepatocytes*. 19.

Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host & Microbe*, *21*(2), 134–142. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004

Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., & Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology*, *9*(9), 1089–1097. https://doi.org/10.1038/ncb1631

Mohamed, B., Mazeaud, C., Baril, M., Poirier, D., Sow, A. A., Chatel-Chaix, L., Titorenko, V., & Lamarre, D. (2020). Very-long-chain fatty acid metabolic capacity of 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 (HSD17B12) promotes replication of hepatitis C virus and related flaviviruses. *Scientific Reports*, *10*(1), 4040. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61051-w

Molina, S., Castet, V., Pichard-Garcia, L., Wychowski, C., Meurs, E., Pascussi, J.-M., Sureau, C., Fabre, J.-M., SaCunha, A., Larrey, D., Dubuisson, J., Coste, J., McKeating, J., Maurel, P., & Fournier-Wirth, C. (2008). Serum-Derived Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes Is Tetraspanin CD81 Dependent. *Journal of Virology*, *82*(1), 569–574. https://doi.org/10.1128/JVI.01443-07

Mondelli, M., Bruno, Savojardo, & Almasio, P. L. (2011). Critical reappraisal of risk factors for occurrence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, 21. https://doi.org/10.2147/HMER.S16991

Moradpour, D., & Penin, F. (2013). Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function. In R. Bartenschlager (Ed.), *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy* (Vol. 369, pp. 113–142). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_5

Moradpour, D., Penin, F., & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(6), 453–463. https://doi.org/10.1038/nrmicro1645

Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K.,

Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., & Koike, K. (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Medicine*, *4*(9), 1065–1067. https://doi.org/10.1038/2053

Morozov, V. A., & Lagaye, S. (2018). Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World Journal of Hepatology*, *10*(2), 186–212. https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i2.186

Moustafa, S., Karakasiliotis, I., & Mavromara, P. (2018). Hepatitis C Virus core+1/ARF Protein Modulates the Cyclin D1/pRb Pathway and Promotes Carcinogenesis. *Journal of Virology*, *92*(9). https://doi.org/10.1128/JVI.02036-17

Mrzljak, A., Tabain, I., Premac, H., Bogdanic, M., Barbic, L., Savic, V., Stevanovic, V., Jelic, A., Mikulic, D., & Vilibic-Cavlek, T. (2019). The Role of Emerging and Neglected Viruses in the Etiology of Hepatitis. *Current Infectious Disease Reports*, *21*(12), 51. https://doi.org/10.1007/s11908-019-0709-2

Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, *29*(3), 487–524. https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15

Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S., & Simos, G. (2006). Identification of MAPK Phosphorylation Sites and Their Role in the Localization and Activity of Hypoxia-inducible Factor-1α. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(44), 33095–33106. https://doi.org/10.1074/jbc.M605058200

Mylonis, I., Sembongi, H., Befani, C., Liakos, P., Siniossoglou, S., & Simos, G. (2012). Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *Journal of Cell Science*, *125*(14), 3485–3493. https://doi.org/10.1242/jcs.106682

N

Naas, T., Ghorbani, M., Alvarez-Maya, I., Lapner, M., Kothary, R., De Repentigny, Y., Gomes, S., Babiuk, L., Giulivi, A., Soare, C., Azizi, A., & Diaz-Mitoma, F. (2005). Characterization of liver histopathology in a transgenic mouse model expressing genotype 1a hepatitis C virus core and envelope proteins 1 and 2. *Journal of General Virology*, *86*(8), 2185–2196. https://doi.org/10.1099/vir.0.80969-0

Narayanan, S., Nieh, A. H., Kenwood, B. M., Davis, C. A., Tosello-Trampont, A.-C., Elich, T. D., Breazeale, S. D., Ward, E., Anderson, R. J., Caldwell, S. H., Hoehn, K. L.,

& Hahn, Y. S. (2016). Distinct Roles for Intracellular and Extracellular Lipids in Hepatitis C Virus Infection. *PLOS ONE*, *11*(6), e0156996. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156996

Narbus, C. M., Israelow, B., Sourisseau, M., Michta, M. L., Hopcraft, S. E., Zeiner, G. M., & Evans, M. J. (2011). HepG2 Cells Expressing MicroRNA miR-122 Support the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle. *Journal of Virology*, *85*(22), 12087–12092. https://doi.org/10.1128/JVI.05843-11

O

Oem, J.-K., Jackel-Cram, C., Li, Y.-P., Zhou, Y., Zhong, J., Shimano, H., Babiuk, L. A., & Liu, Q. (2008). Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2. *Journal of General Virology*, *89*(5), 1225–1230. https://doi.org/10.1099/vir.0.83491-0

Ogawa, E., Nomura, H., Nakamuta, M., Furusyo, N., Kajiwara, E., Dohmen, K., Kawano, A., Ooho, A., Azuma, K., Takahashi, K., Satoh, T., Koyanagi, T., Ichiki, Y., Kuniyoshi, M., Yanagita, K., Amagase, H., Morita, C., Sugimoto, R., Kato, M., … The Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. (2020). Development of Hepatocellular Carcinoma by Patients Aged 75-84 with Chronic Hepatitis C Treated with Direct-acting Antivirals. *The Journal of Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa359

Ogunwobi, O. O., Harricharran, T., Huaman, J., Galuza, A., Odumuwagun, O., Tan, Y., Ma, G. X., & Nguyen, M. T. (2019). Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World Journal of Gastroenterology*, *25*(19), 2279–2293. https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i19.2279

Oinonen, T., & Lindros, O. K. (1998). Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochemical Journal*, *329*(1), 17–35. https://doi.org/10.1042/bj3290017 Okabayashi. (1992). Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1α is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*, *33*(4). https://doi.org/10.3892/ijo_00000058

Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(3), 137–155. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z

P

Pageaux, G., Maurel, P., Coste, J., Larrey, D., Fournier, C., Ducos, J., Sureau, C., & Domergue, J. (1998). In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, *79*(10), 2367–2374. https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-10-2367

Pang, X., Zhang, R., & Cheng, G. (2017). Progress towards understanding the pathogenesis of denguehemorrhagic fever. *Virologica Sinica*, *32*(1), 16–22. https://doi.org/10.1007/s12250-016-3855-9

Papa, S. (1996). Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1276(2), 87–105. https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00077-1

Pasanen, A., Heikkilä, M., Rautavuoma, K., Hirsilä, M., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. (2010). Hypoxia-inducible factor (HIF)-3α is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *42*(7), 1189–1200. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.008

Pawlotsky, J.-M. (2019). DAA failures in African patients with “unusual” HCV subtypes: Hey! Didn’t you know there was another world? *Journal of Hepatology*, *71*(6), 1070–1072. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.09.021

Pekova, L. M., Teocharov, P., & Sakarev, A. (2007). Clinical course and outcome of a nosocomial outbreak of hepatitis C in a urology ward. *Journal of Hospital Infection*, *67*(1), 86–91. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.06.010

Perales, C. (2020). Quasispecies dynamics and clinical significance of hepatitis C virus (HCV) antiviral resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *56*(1), 105562. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.10.005

Perz, J. F., Thompson, N. D., Schaefer, M. K., & Patel, P. R. (2010). US Outbreak Investigations Highlight the Need for Safe Injection Practices and Basic Infection Control. *Clinics in Liver Disease*, *14*(1), 137–151. https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.11.004

Petruzziello, A. (2018). Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV) Related Hepatocellular Carcinoma. *The Open Virology Journal*, *12*(1), 26–32.

https://doi.org/10.2174/1874357901812010026
Petruzziello, A., Marigliano, S., Loquercio, G., Cozzolino, A., & Cacciapuoti, C. (2016). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(34), 7824. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i34.7824

Pileri, P. (1998). Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science*, *282*(5390), 938–941. https://doi.org/10.1126/science.282.5390.938

Piver, E., Boyer, A., Gaillard, J., Bull, A., Beaumont, E., Roingeard, P., & Meunier, J.-C. (2017). Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut*, *66*(8), 1487–1495. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311726

Planas, R., Ballesté, B., Antonio Álvarez, M., Rivera, M., Montoliu, S., Anton Galeras, J., Santos, J., Coll, S., Maria Morillas, R., & Solà, R. (2004). Natural history of decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis. A study of 200 patients. *Journal of Hepatology*, *40*(5), 823–830. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.01.005

Ploss, A., Khetani, S. R., Jones, C. T., Syder, A. J., Trehan, K., Gaysinskaya, V. A., Mu, K., Ritola, K., Rice, C. M., & Bhatia, S. N. (2010). Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(7), 3141–3145. https://doi.org/10.1073/pnas.0915130107

Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., Hernandez, C., Calle, V., Méritet, J., Scatton, O., Dreux, M., Cosset, F., Wakita, T., Bartenschlager, R., Demignot, S., Conti, F., Rosenberg, A. R., & Calmus, Y. (2010). Production of Infectious Hepatitis C Virus in Primary Cultures of Human Adult Hepatocytes. *Gastroenterology*, *139*(4), 1355-1364.e6. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.058

Polyak, S. J., Klein, K. C., Shoji, I., Miyamura, T., & Lingappa, J. R. (2006). *Assemble and Interact: Pleiotropic Functions of the HCV Core Protein*. 31.

Pondé, R. A. de A. (2011). Hidden hazards of HCV transmission. *Medical Microbiology and Immunology*, *200*(1), 7–11. https://doi.org/10.1007/s00430-010-0159-9

Powdrill, M. H., Tchesnokov, E. P., Kozak, R. A., Russell, R. S., Martin, R., Svarovskaia, E. S., Mo, H., Kouyos, R. D., & Gotte, M. (2011). Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(51), 20509–20513. https://doi.org/10.1073/pnas.1105797108

Presence of Zika Virus in Conjunctival Fluid. (2016). 3.

Q

Qiao, L., & Luo, G. G. (2019). Human apolipoprotein E promotes hepatitis B virus infection and production. *PLOS Pathogens*, *15*(8), e1007874. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007874

Quaresma, J. A. S., Duarte, M. I. S., & Vasconcelos, P. F. C. (2006). Midzonal lesions in yellow fever: A specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response. *Medical Hypotheses*, *67*(3), 618–621. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.01.060

R

Raimondi, S., Bruno, S., Mondelli, M. U., & Maisonneuve, P. (2009). Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: A meta-analysis. *Journal of Hepatology*, *50*(6), 1142–1154. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.019

Rankin, E. B., Biju, M. P., Liu, Q., Unger, T. L., Rha, J., Johnson, R. S., Simon, M. C., Keith, B., & Haase, V. H. (2007). Hypoxia-inducible factor–2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(4), 1068–1077. https://doi.org/10.1172/JCI30117

Rankin, E. B., Rha, J., Selak, M. A., Unger, T. L., Keith, B., Liu, Q., & Haase, V. H. (2009). Hypoxia-Inducible Factor 2 Regulates Hepatic Lipid Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(16), 4527–4538. https://doi.org/10.1128/MCB.00200-09

Razavi, H., Sanchez Gonzalez, Y., Yuen, C., & Cornberg, M. (2019). Global timing of hepatitis C virus elimination in high-income countries. *Liver International*. https://doi.org/10.1111/liv.14324

Richard, D. E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D., & Pouysségur, J. (1999). P42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia-inducible Factor 1α (HIF-1α) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(46), 32631–32637. https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32631

Ricklin, M. E., Garcìa-Nicolàs, O., Brechbühl, D., Python, S., Zumkehr, B., Posthaus, H., Oevermann, A., & Summerfield, A. (2016). Japanese encephalitis virus tropism in experimentally infected pigs. *Veterinary Research*, *47*(1), 34. https://doi.org/10.1186/s13567-016-0319-z

Ripoli, M., D'Aprile, A., Quarato, G., Sarasin-Filipowicz, M., Gouttenoire, J., Scrima, R., Cela, O., Boffoli, D., Heim, M. H., Moradpour, D., Capitanio, N., & Piccoli, C. (2010). Hepatitis C Virus-Linked Mitochondrial Dysfunction Promotes Hypoxia-Inducible Factor 1 -Mediated Glycolytic Adaptation. *Journal of Virology*, *84*(1), 647–660. https://doi.org/10.1128/JVI.00769-09

Riva, L., & Dubuisson, J. (2019). Similarities and Differences Between HCV Pseudoparticle (HCVpp) and Cell Culture HCV (HCVcc) in the Study of HCV. In M. Law (Ed.), *Hepatitis C Virus Protocols* (Vol. 1911, pp. 33–45). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8976-8_2

Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(16), 2773–2786. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z

Romero-Brey, I., & Bartenschlager, R. (2014). Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses. *Viruses*, *6*(7), 2826–2857. https://doi.org/10.3390/v6072826

Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *19*(12), 1572–1574. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180

Russell, R. S., Meunier, J.-C., Takikawa, S., Faulk, K., Engle, R. E., Bukh, J., Purcell, R. H., & Emerson, S. U. (2008). Advantages of a single-cycle production assay to study cell culture-adaptive mutations of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(11), 4370–4375. https://doi.org/10.1073/pnas.0800422105

Rustaeus, S., Lindberg, K., Stillemark, P., Claesson, C., Asp, L., Larsson, T., Borén, J., & Olofsson, S.-O. (1999). Assembly of Very Low Density Lipoprotein: A Two-Step Process of Apolipoprotein B Core Lipidation. *The Journal of Nutrition*, *129*(2), 463S-466S. https://doi.org/10.1093/jn/129.2.463S

S

Sainz, B., & Chisari, F. V. (2006). Production of Infectious Hepatitis C Virus by Well-

Differentiated, Growth-Arrested Human Hepatoma-Derived Cells. *Journal of Virology*, *80*(20), 10253–10257. https://doi.org/10.1128/JVI.01059-06

Salloum, S., Wang, H., Ferguson, C., Parton, R. G., & Tai, A. W. (2013). Rab18 Binds to Hepatitis C Virus NS5A and Promotes Interaction between Sites of Viral Replication and Lipid Droplets. *PLoS Pathogens*, *9*(8), e1003513. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003513

Samsa, M. M., Mondotte, J. A., Iglesias, N. G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A. T., Bozza, P. T., & Gamarnik, A. V. (2009). Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathogens*, *5*(10), e1000632. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000632

Sarwar, M. T., Kausar, H., Ijaz, B., Ahmad, W., Ansar, M., Sumrin, A., Ashfaq, U. A., Asad, S., Gull, S., Shahid, I., & Hassan, S. (2011). NS4A protein as a marker of HCV history suggests that different HCV genotypes originally evolved from genotype 1b. *Virology Journal*, *8*(1), 317. https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-317

Scheel, T. K. H., Gottwein, J. M., Jensen, T. B., Prentoe, J. C., Hoegh, A. M., Alter, H. J., Eugen-Olsen, J., & Bukh, J. (2008). Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(3), 997–1002. https://doi.org/10.1073/pnas.0711044105

Schödel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Mole, D. R. (2011). High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*, *117*(23), e207–e217. https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314427

Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F., & Tautz, N. (2009). Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(13), 5342–5347. https://doi.org/10.1073/pnas.0810950106

Schwartz, R. E., Trehan, K., Andrus, L., Sheahan, T. P., Ploss, A., Duncan, S. A., Rice, C. M., & Bhatia, S. N. (2012). Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(7), 2544–2548. https://doi.org/10.1073/pnas.1121400109

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors: Mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, *33*(4), 207–214. https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.01.005

Semenza, G. L. (2014). Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *9*(1), 47–71. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104720

Semenza, G. L., Jiang, B.-H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J.-P., Maire, P., & Giallongo, A. (1996). Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(51), 32529–32537. https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32529

Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J., & Bartenschlager, R. (2007). The Lipid Droplet Binding Domain of Hepatitis C Virus Core Protein Is a Major Determinant for Efficient Virus Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(51), 37158–37169. https://doi.org/10.1074/jbc.M707329200

Shimotohno, K. (2021). HCV Assembly and Egress via Modifications in Host Lipid Metabolic Systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *11*(1), a036814. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036814

Shin, J. Y., Hur, W., Wang, J. S., Jang, J. W., Kim, C. W., Bae, S. H., Jang, S. K., Yang, S. H., Sung, Y. C., Kwon, O. J., & Yoon, S. K. (2005). HCV core protein promotes liver fibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF-β1. *Experimental & Molecular Medicine*, *37*(2), 138–145. https://doi.org/10.1038/emm.2005.19

Shlomai, A., Schwartz, R. E., Ramanan, V., Bhatta, A., de Jong, Y. P., Bhatia, S. N., & Rice, C. M. (2014). Modeling host interactions with hepatitis B virus using primary and induced pluripotent stem cell-derived hepatocellular systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(33), 12193–12198. https://doi.org/10.1073/pnas.1412631111

Siddiqi, S. A. (2008). VLDL exits from the endoplasmic reticulum in a specialized vesicle, the VLDL transport vesicle, in rat primary hepatocytes. *Biochemical Journal*, *413*(2), 333–342. https://doi.org/10.1042/BJ20071469

Simister, P., Schmitt, M., Geitmann, M., Wicht, O., Danielson, U. H., Klein, R., Bressanelli, S., & Lohmann, V. (2009). Structural and Functional Analysis of Hepatitis C Virus Strain JFH1 Polymerase. *Journal of Virology*, *83*(22), 11926–11939. https://doi.org/10.1128/JVI.01008-09

Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & ICTV Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, *98*(1), 2–3. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672

Song, Z., Cai, J., Liu, Y., Zhao, D., Yong, J., Duo, S., Song, X., Guo, Y., Zhao, Y., Qin, H., Yin, X., Wu, C., Che, J., Lu, S., Ding, M., & Deng, H. (2009). Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Research*,

19(11), 1233–1242. https://doi.org/10.1038/cr.2009.107

Souza, B. S. F., Sampaio, G. L. A., Pereira, C. S., Campos, G. S., Sardi, S. I., Freitas, L. A. R., Figueira, C. P., Paredes, B. D., Nonaka, C. K. V., Azevedo, C. M., Rocha, V. P. C., Bandeira, A. C., Mendez-Otero, R., dos Santos, R. R., & Soares, M. B. P. (2016). Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Scientific Reports*, *6*(1). https://doi.org/10.1038/srep39775

Steenbergen, R. H. G., Joyce, M. A., Thomas, B. S., Jones, D., Law, J., Russell, R., Houghton, M., & Tyrrell, D. L. (2013). Human serum leads to differentiation of human hepatoma cells, restoration of very-low-density lipoprotein secretion, and a 1000-fold increase in HCV Japanese fulminant hepatitis type 1 titers. *Hepatology*, *58*(6), 1907–1917. https://doi.org/10.1002/hep.26566

Steininger, C., Kundi, M., Jatzko, G., Kiss, H., Lischka, A., & Holzmann, H. (2003). Increased Risk of Mother-to-Infant Transmission of Hepatitis C Virus by Intrapartum Infantile Exposure to Maternal Blood. *The Journal of Infectious Diseases*, *187*(3), 345–351. https://doi.org/10.1086/367704

Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R., & Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathogens*, *3*(7), e103. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030103

Steinmann, E., & Pietschmann, T. (2013). Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus. In R. Bartenschlager (Ed.), *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy* (Vol. 369, pp. 17–48). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_2

Stenvall, A., Larsson, E., Strand, S.-E., & Jönsson, B.-A. (2014). A small-scale anatomical dosimetry model of the liver. *Physics in Medicine and Biology*, *59*(13), 3353–3371. https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/13/3353

Street, A., Macdonald, A., Crowder, K., & Harris, M. (2004). The Hepatitis C Virus NS5A Protein Activates a Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Survival Signaling Cascade. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 12232–12241. https://doi.org/10.1074/jbc.M312245200

Ströh, L. J., & Krey, T. (2020). HCV Glycoprotein Structure and Implications for B-Cell Vaccine Development. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6781. https://doi.org/10.3390/ijms21186781

Strosberg, A. D., Kota, S., Takahashi, V., Snyder, J. K., & Mousseau, G. (2010). Core as a Novel Viral Target for Hepatitis C Drugs. *Viruses*, *2*(8), 1734–1751.

https://doi.org/10.3390/v2081734

Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., & Gale, M. (2005). Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *Journal of Virology*, *79*(5), 2689–2699. https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2689-2699.2005

Suzuki, T. (2017). Hepatitis C Virus Replication. In M. Tagaya & T. Simmen (Eds.), *Organelle Contact Sites* (Vol. 997, pp. 199–209). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4567-7_15

Swift, L. L. (1995). Assembly of very low density lipoproteins in rat liver: A study of nascent particles recovered from the rough endoplasmic reticulum. *Journal of Lipid Research*, *36*(3), 395–406. https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39874-6

Swift, L. L. (1996). Role of the Golgi Apparatus in the Phosphorylation of Apolipoprotein B. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(49), 31491–31495. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)79016-4

Syed, G. H., Khan, M., Yang, S., & Siddiqui, A. (2017). Hepatitis C Virus Lipoviroparticles Assemble in the Endoplasmic Reticulum (ER) and Bud off from the ER to the Golgi Compartment in COPII Vesicles. *Journal of Virology*, *91*(15). https://doi.org/10.1128/JVI.00499-17

T

Tabata, K., Neufeldt, C. J., & Bartenschlager, R. (2020). Hepatitis C Virus Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *10*(3), a037093. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037093

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861–872. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019

Taniguchi, H., Kato, N., Otsuka, M., Goto, T., Yoshida, H., Shiratori, Y., & Omata, M. (2004). Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-?1 transcription. *Journal of Medical Virology*, *72*(1), 52–59. https://doi.org/10.1002/jmv.10545

Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., & Treadaway, J. (2008). Regulation of Hepatitis C

Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathogens*, *4*(3), e1000032. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000032

Terrault, N. A. (2002). Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology*, *36*(S1), S99–S105. https://doi.org/10.1002/hep.1840360713

Thi, V. L. D., Granier, C., Zeisel, M. B., Guérin, M., Mancip, J., Granio, O., Penin, F., Lavillette, D., Bartenschlager, R., Baumert, T. F., Cosset, F.-L., & Dreux, M. (2012). *Characterization of Hepatitis C Virus Particle Subpopulations Reveals Multiple Usage of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps*□S*. *287*(37), 16.

Thio, C. L., Gao, X., Goedert, J. J., Vlahov, D., Nelson, K. E., Hilgartner, M. W., O'Brien, S. J., Karacki, P., Astemborski, J., Carrington, M., & Thomas, D. L. (2002). *HLA-Cw*04* and Hepatitis C Virus Persistence. *Journal of Virology*, *76*(10), 4792–4797. https://doi.org/10.1128/JVI.76.10.4792-4797.2002

Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'hUigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S. I., Alexander, G., Goedert, J. J., Kirk, G. D., Donfield, S. M., Rosen, H. R., Tobler, L. H., Busch, M. P., McHutchison, J. G., Goldstein, D. B., & Carrington, M. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, *461*(7265), 798–801. https://doi.org/10.1038/nature08463

Thompson, S. C., Boughton, C. R., & Dore, G. J. (2003). Blood-borne viruses and their survival in the environment: Is public concern about community needlestick exposures justified? *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, *27*(6), 602–607. https://doi.org/10.1111/j.1467-842X.2003.tb00606.x

Thomssen, R., Bonk, S., & Propfe, C. (1992). *Association of hepatitis C virus in human sera with I -lipoprotein*. 8.

Tong, Y., Lavillette, D., Li, Q., & Zhong, J. (2018). Role of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 in Virus Entry and Assembly. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01411

Touboul, T., Hannan, N. R. F., Corbineau, S., Martinez, A., Martinet, C., Branchereau, S., Mainot, S., Strick-Marchand, H., Pedersen, R., Di Santo, J., Weber, A., & Vallier, L. (2010). Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology*, *51*(5), 1754–1765. https://doi.org/10.1002/hep.23506

Tran, K., Thorne-Tjomsland, G., DeLong, C. J., Cui, Z., Shan, J., Burton, L., Jamieson, J. C., & Yao, Z. (2002). Intracellular Assembly of Very Low Density Lipoproteins Containing Apolipoprotein B100 in Rat Hepatoma McA-RH7777 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(34), 31187–31200. https://doi.org/10.1074/jbc.M200249200

Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, *27*(21), R1147–R1151. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019

Tsukiyama-Kohara, K., & Kohara, M. (2017). Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 23. https://doi.org/10.3390/ijms19010023

Tufon, K. A., Meriki, H. D., Kwenti, T. E., Tony, N. J., Malika, E., Bolimo, A. F., Kouanou, Y. S., Nkuo-Akenji, T., & Anong, D. N. (2019). HBV Transmission Risk Assessment in Healthcare Workers, Household and Sexual Contacts of HBV Infected Patients in the Southwest Region of Cameroon. *Oman Medical Journal*, *34*(4), 313–321. https://doi.org/10.5001/omj.2019.62

U

Ujino, S., Nishitsuji, H., Hishiki, T., Sugiyama, K., Takaku, H., & Shimotohno, K. (2016). Hepatitis C virus utilizes VLDLR as a novel entry pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(1), 188–193. https://doi.org/10.1073/pnas.1506524113

V

Vassilaki, N., Kalliampakou, K. I., Kotta-Loizou, I., Befani, C., Liakos, P., Simos, G., Mentis, A. F., Kalliaropoulos, A., Doumba, P. P., Smirlis, D., Foka, P., Bauhofer, O., Poenisch, M., Windisch, M. P., Lee, M. E., Koskinas, J., Bartenschlager, R., & Mavromara, P. (2013). Low Oxygen Tension Enhances Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Virology*, *87*(5), 2935–2948. https://doi.org/10.1128/JVI.02534-12

Vieyres, G., & Pietschmann, T. (2019). HCV Pit Stop at the Lipid Droplet: Refuel Lipids and Put on a Lipoprotein Coat before Exit. *Cells*, *8*(3), 233. https://doi.org/10.3390/cells8030233

Vogt, D. A., Camus, G., Herker, E., Webster, B. R., Tsou, C.-L., Greene, W. C., Yen, T.-S. B., & Ott, M. (2013). Lipid Droplet-Binding Protein TIP47 Regulates Hepatitis C Virus RNA Replication through Interaction with the Viral NS5A Protein. *PLoS Pathogens*, *9*(4), e1003302. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003302

W

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., & Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*, *11*(7), 791–796. https://doi.org/10.1038/nm1268

Walther, T. C., Chung, J., & Jr, R. V. F. (2017). *Lipid Droplet Biogenesis*. 20.

Webb, E. A., AlMutair, A., Kelberman, D., Bacchelli, C., Chanudet, E., Lescai, F., Andoniadou, C. L., Banyan, A., Alsawaid, A., Alrifai, M. T., Alahmesh, M. A., Balwi, M., Mousavy-Gharavy, S. N., Lukovic, B., Burke, D., McCabe, M. J., Kasia, T., Kleta, R., Stupka, E., … Dattani, M. T. (2013). ARNT2 mutation causes hypopituitarism, post-natal microcephaly, visual and renal anomalies. *Brain*, *136*(10), 3096–3105. https://doi.org/10.1093/brain/awt218

Welsch, C., Albrecht, M., Maydt, J., Herrmann, E., Welker, M. W., Sarrazin, C., Scheidig, A., Lengauer, T., & Zeuzem, S. (2007). Structural and functional comparison of the non-structural protein 4B in flaviviridae. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *26*(2), 546–557. https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2007.03.012

Westbrook, R. H., & Dusheiko, G. (2014). Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology*, *61*(1), S58–S68. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012

Wilfling, F., Thiam, A. R., Olarte, M.-J., Wang, J., Beck, R., Gould, T. J., Allgeyer, E. S., Pincet, F., Bewersdorf, J., Farese, R. V., & Walther, T. C. (2014). Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *ELife*, *3*, e01607. https://doi.org/10.7554/eLife.01607

Wilfling, F., Wang, H., Haas, J. T., Krahmer, N., Gould, T. J., Uchida, A., Cheng, J.-X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., Liu, X., Buhman, K. K., Coleman, R. A., Bewersdorf, J., Farese, R. V., & Walther, T. C. (2013). Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. *Developmental Cell*, *24*(4), 384–399. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.013

Windisch, M. P., Frese, M., Kaul, A., Trippler, M., Lohmann, V., & Bartenschlager, R. (2005). Dissecting the Interferon-Induced Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Using a Novel Host Cell Line. *Journal of Virology*, *79*(21), 13778–13793. https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13778-13793.2005

Wrensch, F., Crouchet, E., Ligat, G., Zeisel, M. B., Keck, Z.-Y., Foung, S. K. H., Schuster, C., & Baumert, T. F. (2018). Hepatitis C Virus (HCV)–Apolipoprotein Interactions and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1436. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01436

X

Xu, Z. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *The EMBO Journal*, *20*(14), 3840–3848. https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3840

Y

Yamamoto, T., Takahashi, S., Moriwaki, Y., Hada, T., & Higashino, K. (1987). A newly discovered apolipoprotein B-containing high-density lipoprotein produced by human hepatoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *922*(2), 177–183. https://doi.org/10.1016/0005-2760(87)90152-4

Yang, S.-L., Wu, C., Xiong, Z.-F., & Fang, X. (2015). Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Molecular Medicine Reports*, *12*(2), 2411–2416. https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3689

Yi, M., Villanueva, R. A., Thomas, D. L., Wakita, T., & Lemon, S. M. (2006). Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *MEDICAL SCIENCES*, 6.

Ying, B., Pang, S., Yang, J., Zhong, Y., & Wang, J. (2019). Computational Study of HCV p7 Channel: Insight into a New Strategy for HCV Inhibitor Design. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, *11*(2), 292–299. https://doi.org/10.1007/s12539-018-0306-3

Yoshida, T., Takayama, K., Kondoh, M., Sakurai, F., Tani, H., Sakamoto, N., Matsuura, Y., Mizuguchi, H., & Yagi, K. (2011). Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *416*(1–2), 119–124. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.007

Yost, S. A., Wang, Y., & Marcotrigiano, J. (2018). Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins: A Balancing Act of Order and Disorder. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01917

Z

Zahid, M. N., Turek, M., Xiao, F., Thi, V. L. D., Gu, M., Bachellier, P., Thompson, J., Delang, L., Neyts, J., Bankwitz, D., Pietschmann, T., Dreux, M., Cosset, F.-L., Grunert, F., Baumert, T. F., & Zeisel, M. B. (2013). *The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination*. *57*(2), 13.

Zhang, Z., Trippler, M., Real, C. I., Werner, M., Luo, X., Schefczyk, S., Kemper, T., Anastasiou, O. E., Ladiges, Y., Treckmann, J., Paul, A., Baba, H. A., Allweiss, L., Dandri, M., Gerken, G., Wedemeyer, H., Schlaak, J. F., Lu, M., & Broering, R. (2020). Hepatitis B Virus Particles Activate Toll-Like Receptor 2 Signaling Initially Upon Infection of Primary Human Hepatocytes. *Hepatology*, *72*(3), 829–844. https://doi.org/10.1002/hep.31112

Zhou, M., Zhao, K., Yao, Y., Yuan, Y., Pei, R., Wang, Y., Chen, J., Hu, X., Zhou, Y., Chen, X., & Wu, C. (2017). Productive HBV infection of well-differentiated, hNTCP-expressing human hepatoma-derived (Huh7) cells. *Virologica Sinica*, *32*(6), 465–475. https://doi.org/10.1007/s12250-017-3983-x

Zhou, X., Sun, P., Lucendo-Villarin, B., Angus, A. G. N., Szkolnicka, D., Cameron, K., Farnworth, S. L., Patel, A. H., & Hay, D. C. (2014). Modulating Innate Immunity Improves Hepatitis C Virus Infection and Replication in Stem Cell-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Reports*, *3*(1), 204–214. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.04.018

Jade COCHARD

Combinaison de la différenciation cellulaire et de l'hypoxie physiologique pour l'étude *in vitro* du virus de l'hépatite C : Extension à d'autres *Flaviviridae*

Résumé

L'étude in vitro des virus de la famille des Flaviviridae, qui présentent dans des degrés divers un tropisme hépatique, est classiquement réalisée sous une concentration atmosphérique en oxygène (21% d'O2 - normoxie) alors que celle mesurée dans le foie est comprise entre 3% et 8% d'O2 (hypoxie). Cette thèse s'est intéressée à l'étude de certains virus de la famille des Flaviviridae, particulièrement le virus de l'hépatite C (VHC) dans un environnement hypoxique. Ce travail a montré la production de virions du VHC, proches des particules virales natives, par des cellules différenciées et cultivées en hypoxie prolongée. De plus, ces conditions de culture représentent un environnement également favorable pour le cycle du virus de la Dengue. Enfin, cette thèse a déterminé que le virus Zika dégrade, par une voie non conventionnelle des facteurs de transcription centraux pour la survie cellulaire en hypoxie, apportant de nouvelles informations quant à la physiopathologie liée à ce virus. En somme ce travail ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle de l'oxygénation avec ou sans différenciation cellulaire sur le cycle des virus hépatotropes.

Virus de l'hépatite C – Différenciation cellulaire – Hypoxie – Virus de la Dengue – Virus Zika

Résumé en anglais

In vitro study of viruses that belong to the Flaviviridae family, presenting in different extent a hepatic tropism, is conventionally performed under atmospheric oxygen concentration (normoxia – 21% O2) while that measured in the liver is between 3% and 8% O2 (hypoxia). This thesis was interested in the study of some viruses that belong to the Flaviviridae family, in particular hepatitis c virus (VHC) in a hypoxic environment. Therefore, this work showed the production of VHC virions, close to the native ones in differentiated hypoxia-cultured cells. Interestingly, those culture conditions represent an environment conductive to Dengue virus infection. Finally this thesis identify that Zika virus down-regulates, through an unconventional pathway, cellular transcription factors, essential for cellular survival in hypoxia. These results bring new information relative to Zika virus physiopathology. In sum this work opens up new perspectives about oxygenation role, with or without on hepatotropic viruses' cycle.

Hepatitis c virus – Cell differentiation – Hypoxia – Dengue virus – Zika virus