

La réplication virale du virus de la dengue dans les hépatocytes dépend de l'isoforme d'hexokinase exprimée Marianne Figl

► To cite this version:

Marianne Figl. La réplication virale du virus de la dengue dans les hépatocytes dépend de l'isoforme d'hexokinase exprimée. Virologie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT: 2020LYSE1116. tel-03419622

HAL Id: tel-03419622 https://theses.hal.science/tel-03419622

Submitted on 8 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1116

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED-340 **Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

> Spécialité de doctorat : Virologie Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 03/07/2020, par : Marianne FIGL

La réplication du virus de la dengue dans les cellules hépatocytaires dépend de l'isoforme d'hexokinase exprimée.

Devant le jury composé de :

Nom, prénom, grade/qualité AMARA Ali, DR LECOLLINET Sylvie, DR FAURE Mathias, PU ARCHER Fabienne, DR ROCHE Marjolaine, MCU DIAZ Olivier, MCU établissement/entreprise Centre de Recherche Jean Bernard ANSES Université de Lyon INRAE Université de la Réunion Université de Lyon

Rapporteur Rapportrice Examinateur/Président Examinatrice Examinatrice Directeur de thèse

Préambule

I. Composition de l'Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université
Président du Conseil Académique
Vice-Président du Conseil d'Administration
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire
Vice-Président de la Commission de Recherche
Directeur Général des Services

- M. Frédéric FLEURY
- M. Hamda BEN HADID
- M. Didier REVEL
- M. Philippe CHEVALLIER
- M. Jean-François MORNEX
- M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE		
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON		
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX		
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA		
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT		
Département de Formation et Centre de Recherche			
en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT		

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP) Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique	(CPE Lyon) Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

II. Sommaire

Préambule	
I. Composition de l'Université Claude Bernard – LYON 1	5
II. Sommaire	7
III. Remerciements	11
IV. Listes des figures et tableaux	
V. Lexique	17
Introduction	21
Chapitre 1 : Le Métabolisme Central du Carbone	23
I. La glycolyse	26
1) L'entrée du glucose dans la cellule	27
A- Les protéines GLUTs	27
B- Le co-transport	
2) Réactions de la glycolyse	
A- Phase consommatrice d'énergie de la glycolyse	
B- Phase de production d'ATP, pyruvate et de cofacteur NADH,H+	
C- Bilan énergétique de la glycolyse	
D- Les enzymes de la glycolyse	
3) Les HKS, les premieres enzymes de la grycoryse	
A- Structures des HKS	/ 3
A) Le concent d'allostérie	+4 17
5) L'activation alpha et béta et les conséquences sur l'allostérie	,
6) Régulation de HK4 par GKRP	52
7) HK4 et la clinique	53
8) Les autres fonctions de l'HK	
II. Virus et énergie de réplication	57
1) Virus et glycolyse	
2) Virus et métabolisme lipidique	60
A- L'entrée des virus dans la cellule	61
B- La réplication virale	63
C- Importance des gouttelettes lipidiques	
D- Sécrétion virale	69
3) Induction de la lipogénèse dans l'hépatocyte	69

Chapitre 2 : Les virus et les réactions immunitaires	72
I. Les mécanismes de contrôle des pathogènes	73
1) Les DRR des récenteurs de l'immunité innée	73
 Les autres mécanismes de contrôle de l'infection virale 	<i>73</i> 79
II. Les virus interfèrent avec les voies de l'immunité innée	81
Chapitre 3 : Le DENV, un exemple d'arbovirus	84
I. Les Arbovirus	84
II. Le DENV, un membre de la famille des <i>flavivirus</i>	84
1) Une famille de virus principalement transmis par les moustiques	84
2) Les cycles d'infection du DENV chez l'homme et les primates non-humains.	86
3) Les moustiques et leur résistance	88
III. Développement du nombre d'infection par le DENV	89
IV. Origine du DENV et manifestations cliniques de la pathologie	91
V. Structure du virion et fonctions des protéines virales du DENV	96
1) Les protéines structurales	98
A- La protéine E d'enveloppe	98
B- La protéine de membrane prM/M	98
C- La protéine de capside, C	99
2) Les protéines non-structurales (NS)	100
A- NS1	100
B- Les protéines NS2A, NS2B, NS4A et NS4B	101
C- NS3	101
D- NS5	102
VI. Le cycle de réplication du DENV	104
1) L'internalisation du virus dans les cellules	105
2) La réplication du DENV dans les cellules	109
3) La maturation des virions et leur sécrétion	112
Chapitre 4 : Rationnel et Objectifs de l'étude	114
I. Présentation des modèles cellulaires d'étude	114
II. Interactome des protéines DENV et des enzymes humaines du CCM	116
III. Objectifs de l'étude	118

I Culture collulaire	
1) Culture des cellules	
2) Création du modèle cellulaire HuH7 HK4+ HK2	
3) Traitement des cellules	
II. Infections et électroporations des cellules avec le DENV	
1) Production des ARNs viraux	
2) Electroporations des ARN	
3) Analyse de la réplication en laboratoire de confinement de niveau 2	
4) Production des stocks de virus au laboratoire de confinement de niveau	. 3
5) Infections réalisées au laboratoire de confinement de niveau 3	
III. Analyse des résultats de cytométrie en flux	
IV. Titration virale par FFU	
V Extraction dos APN viroux dos surnagoants	
V. Extraction des ANIX viraux des sur nageants	•••••
VI RT-aPCR des ARN viraux	
VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western	1-Blot
VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV : HKs et GKRP	n-Blot avec les
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA) 	n-Blot avec les
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA) 2) Co-immunoprécipitation (CoIP) 	n-Blot avec les
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA) 2) Co-immunoprécipitation (CoIP) 3) Le système nano-luciférase (NanoLuc two hybrid) 	n-Blot avec les
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA)	n-Blot avec les
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA)	n-Blot avec les
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA) 2) Co-immunoprécipitation (CoIP) 3) Le système nano-luciférase (NanoLuc two hybrid) X. Fractionnement cellulaire XI. Marquage et quantification des lipides neutres intracellulaires 1) Marquage Oil Red O (ORO) des gouttelettes lipidiques 	n-Blot
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA)	n-Blot avec les
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA)	n-Blot
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA)	n-Blot
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Western IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA)	n-Blot avec les
 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par Westerr IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV a HKs et GKRP 1) Crible par complémentation protéique (PCA)	n-Blot . avec les

XV. Mesure d'activité protéase de NS3 du DENV	146
XVI. Analyses statistiques	147
Travaux réalisés	149
I. L'isoenzyme d'HK exprimée par les cellules conditionne la cinétique de l'infection des HuH7 par le DENV	150
1) Comparaison de la cinétique d'infection par le DENV dans les cellules HuH	7 et
 2) Les cellules HuH7 HK4+ HK2- répliquent mieux le DENV que les cellules HuH7. 	150
II. L'infection par le DENV induit une augmentation de la consommation de glucose cellulaire	163
III. Interaction de NS3 avec les HKs et effet de NS3 sur le métabolisme cellulaire	173
 L'interaction de NS3 avec les HKs cellulaires Effets de NS3 sur le métabolisme cellulaire 	174 177
IV. Influence de la modulation de l'activité de l'HK4 sur la réplication DENV	183
Discussion & conclusions	193
Références bibliographiques	207
Annexes	233
Liste des publications et posters	234
Abstract Rósumó	235
ксуппс	230

III. Remerciements

Après 4 années de dur labeur voici venir pour moi le temps des remerciements.

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Vincent Lotteau et Patrice André pour m'avoir acceptée dans leur équipe et sans qui cette thèse n'aurait jamais pu commencer.

Olivier, mon directeur de thèse pour son soutien, ses précieux conseils et ses encouragements. Même si je n'avais jamais fait de virologie avant d'arriver au laboratoire, tu m'as accordé ta confiance et m'a appris à me dépasser et à poser les bonnes « questions biologiques ». Un grand merci.

Je remercie également Madame Sylvie Lecollinet et Monsieur Ali Amara de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Mesdames Fabienne Archer, Marjolaine Roche et Monsieur Mathias Faure d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à Marjolaine Roche, Antoine Marçais et Pierre-Olivier Vidalain pour m'avoir apporté leurs expertises et leurs conseils au cours de mes différents comités de suivi de thèse.

Je remercie également l'ensemble des personnels des plateformes de cytométrie et du laboratoire P3 de l'Université de Lyon pour leur accueil, leur sympathie et leur disponibilité.

Merci à l'ensemble de l'équipe et en particulier aux « jeunes » du labo, Clémence, Camille, Nolwenn, Pauline, Adrien et les ex-labo Cindy, Benoît, Karim qui sont aujourd'hui des amis. Cindy, un grand merci pour ton aide pour l'étude des interactions et ta disponibilité lorsque j'avais des doutes ou des questions. Merci à Anne pour ta gentillesse, ta bonne humeur et nos discussions lors des pauses du midi.

J'ai une pensée toute particulière pour Clémence : tu m'as toujours aidée depuis mon arrivée dans l'équipe et tes conseils sont toujours pertinents. A tous nos moments « hors labo » le plus beau restant notre voyage en Afrique, j'espère qu'il y en aura d'autres !

Je tiens à remercier mes parents pour l'éducation qu'ils m'ont donnée. La persévérance, le goût de l'effort et l'ouverture d'esprit qu'ils m'ont permis de développer m'ont été d'une

grande aide pour tout mon parcours. A toutes ces heures passées à me faire réciter, me rassurer, m'aider, pour m'avoir toujours soutenue et accompagnée dans mes études et dans ma vie : Merci !

A ma mamie Marcelle qui est si fière de moi et qui traverse des moments difficiles. A ma sœur, mon frère et toute ma famille et belle-famille et leur photocopieuse qui a bien chauffé les dernières semaines !

A tous mes amis et en particulier Elodie, Emilie, les filles, l'équipe des visiteurs, les canadiens, les CIRIens... merci d'être toujours là pour moi et de m'avoir changé les idées.

Enfin je tiens à remercier grandement celui qui partage ma vie depuis déjà trois ans, qui m'a soutenue dans les moments les plus durs et m'a plus que jamais encouragée dans cette dernière étape de rédaction si particulière avec le confinement, mon Charles.

IV. Listes des figures et tableaux

Liste de figures

Figure 1 : Principales voies métaboliques induites par les virus	25
Figure 2 : Schéma d'une protéine GLUT	28
Figure 3 : Contrôle de la translocation à la membrane de GLUT4 par l'insuline chez l'ho	omme
	29
Figure 4 : Le devenir du glucose-6-phosphate dans les cellules	38
Figure 5 : Modèles d'évolution ayant conduit à l'apparition d'HK4	40
Figure 6 : Modèle d'évolution ayant conduit à l'apparition des différentes HKs proposé	par
Irwin et Tan	42
Figure 7 : Régulation tissulaire de l'expression d'HK4	46
<u>Figure 8 :</u> Structure de l'hexokinase 4	49
Figure 9 : Modèles cinétiques de l'hexokinase 4	50
Figure 10 : Régulation de l'association entre HK4 et GKRP	53
Figure 11 : Illustrations de l'utilisation des lipides comme cofacteurs d'entrée des particu	ules
virales pour le polyomavirus (A), HCV (B) et HIV (C).	62
Figure 12 : Composition d'une gouttelette lipidique	66
<u>Figure 13 :</u> Les modèles de genèse des LDs	68
Figure 14 : Structure de la protéine chREBP	70
Figure 15 : Voie des pentoses phosphates et synthèse d'AGs	71
Figure 16 : Représentation des voies d'induction de l'expression de l'IFN-I suite à la	
reconnaissance d'ARN double-brins : RIG-I, MDA-5 et TLR3	76
Figure 17 : Voie de signalisation en aval du récepteur à l'IFN-I	77
Figure 18 : Rétrocontrôle de l'IFN	79
Figure 19 : Le contrôle de l'infection par le système du complément	80
Figure 20 : Arbre phylogénétique des <i>Flaviviridae</i>	84

Figure 21 : Arbre phylogénétique de la famille des <i>flavivirus</i> généré après alignement des
séquences génétiques complètes des virus
Figure 22 : Photographie de moustique du genre Aedes
Figure 23 : Cycle urbain et sylvatique de transmission du DENV
Figure 24 : Distribution du DENV dans le monde en 2016 d'après WHO90
Figure 25 : Carte d'implantation du moustique Aedes albopictus en France métropolitaine,
2018
<u>Figure 26 :</u> Manifestions et évolution de l'infection DENV
Figure 27 : Illustration du phénomène de Hoskins comme observé dans la DENV
Figure 28 : Facteurs interagissant et déterminant en partie la sévérité du DENV
Figure 29 : Schéma de la structure de la particule virale DENV
Figure 30 : Organisation du virion DENV
<u>Figure 31 :</u> Cycle de vie des virus <i>flavivirus</i> , exemple du DENV 104
<u>Figure 32 :</u> Les différents récepteurs au DENV
Figure 33 : Schéma de la réplication DENV
Figure 34 : Evolution de la structure des virions DENV 112
Figure 35 : Evolution des protéines de surface du DENV 113
Figure 36 : Schéma explicatif de l'obtention de la lignée HuH7 HK4+ HK2 115
Figure 37 : Représentations schématiques des constructions DENV utilisées pour l'étude 123
Figure 38 : Présentation des différentes combinaisons protéines-fragments de nano-luciférase
Figure 39 : Observation au microscope à fluorescence de cellules infectées par le DENV 72
heures post-infection à une MOI de 0,1
Figure 40 : Nombre total de cellules dans les puits de culture 0, 24, 48 ou 72 heures post-
infection
Figure 41 : Cinétique d'infection par le DENV des cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2153
Figure 42 : Profils FACS d'infection des cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2154
Figure 43 : Titre infectieux et infectivité spécifique des particules virales dans les surnageants
de chaque type cellulaire
Figure 44 : Réplication du rSg DENV dans les cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2 158
<u>Figure 45 :</u> Réplication du rSg DENV en fonction de la quantité d'HK4 exprimée
Figure 46 : Effets de la surexpression d'HK2 sur la réplication rSg et l'activité HK 162

Figure 47 : Effet du DENV sur la consommation de glucose des cellules HuH7 et HuH7
HK4+ HK2
Figure 48 : Expression des protéines GLUTs dans les différents modèles d'étude électroporés
ou non avec le rSg DENV
Figure 49 : Réplication du rSg DENV dans un milieu contenant du glucose ou du galactose
Figure 50 : Effet de la réplication du rSg DENV sur la quantité de TGs et l'activité HK en
cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2
Figure 51 : Effet du traitement à l'acide oléique sur le contenu en lipides neutres des cellules
HuH7 et HuH7 HK4+ HK2- et sur la réplication du rSg DENV
Figure 52 : Effet du traitement palmitate sur la réplication rSg DENV en cellules HuH7 et
HuH7 HK4+ HK2
Figure 53 : Crible d'interaction de NS3 DENV avec des protéines du métabolisme
cellulaire
Figure 54 : Interaction de DENV NS3 avec les HKs
Figure 55 : Effet de l'expression de NS3 sur la glycolyse des cellules HuH7 et HuH7 HK4+
HK2
Figure 56 : Effet de NS3 sur la quantité de lipides neutres intracellulaires
Figure 57 : Schéma simplifié de la régulation négative d'HK4 par le régulateur GKRP 183
Figure 58 : Effet de la modulation d'HK4 par GKRP sur la réplication rSg DENV dans les
cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2
Figure 59 : Schéma de la régulation de l'association HK4-GKRP par le fructose-1- ou -6-
phosphate
Figure 60 : Effet de la modulation de l'interaction entre GKRP et HK sur la réplication du rSg
DENV
Figure 61 : Effet du LY2608204 sur la réplication rSg DENV
Figure 62 : Interaction de DENV NS3 avec GKRP
Figure 63 : Localisation subcellulaire de DENV NS3 suivant le type cellulaire et la
surexpression ou non de GKRP 190
Figure 64 : Activité protéase de NS3 du DENV en cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2 191

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des différents transporteurs GLUTs, leurs sites d'expression et	
affinités pour leurs substrats	33
Tableau 2 : Récapitulatif des différents transporteurs SGLTs, leurs sites d'expression et	
affinités pour leurs substrats	34
Tableau 3 : Récapitulatif des principales caractéristiques des différentes HKs	14
Tableau 4 : Les différents types d'IFN	72
Tableau 5 : Les différents TLRs et leurs PAMPs chez l'homme	74
Tableau 6 : Les différents plasmides utilisés pour la transfection de cellules pour l'expression	1
de protéines virales NS et d'enzymes cellulaires humaines	34
Tableau 7 : Récapitulatif des différents anticorps utilisés	37
Tableau 8 : Récapitulatif des différentes interactions testées	39
Tableau 9 : Mix réactionnel pour mesurer l'activité HK	16

V. Lexique

AA : Acides aminés **ADE** : Antibody-Dependant Enhancement ADN : Acide désoxyribonucléique ARN : Acide ribonucléique AGs : Acides gras APO: Apolipoprotéines **ATP**: Adénosine-triphosphate **<u>BMP</u>**: Bis-mono-acyl-glycerol-phosphate Caspase : Cysteine Aspartic Acid-Specific protease chREBP : Carbohydrate responsive element binding protein **CoIP**: Coimmunoprécipitation **DAG**: Diacylglycérol **DENV :** Virus de la dengue **<u>DF</u>**: Fièvre de la dengue **DHF** : Fièvre hémorragique de la dengue DSS : Syndrôme de choc de la dengue FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting FAS : Enzyme synthétisant les acides gras FFU: Focus Forming Units FITC : Molécule d'isothiocyanate de fluorescéine **GAGs**: Glycoaminoglycanes GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase GCK (HK4) : Glucokinase (Hexokinase 4) **GKRP (GCKR) :** Protéine régulant l'activité glucokinase GLUT : Transporteur du glucose HadV : Adénovirus humain HCMV: Cytomegalovirus humain HCV : Virus de l'hépatite C HDL : Lipoprotéines de haute densité HHVs : Virus d'herpès humains HIV : Virus de l'immunodéficience humaine HK: Hexokinase

HKDC1: Hexokinase Domain Containing 1 HPV: Papillomavirus humain HRP: Enzyme peroxydase de raifort HSP : Protéines du choc thermique **INF**: Interféron ISGs : Gènes de réponse à l'interféron ISRE : Eléments de réponse à l'interféron **ITP**: Inosine-triphosphate KM : Constante de Michaelis KSHV : Herpèvirus LDs : Gouttelettes lipidiques LDL : Lipoprotéine de faible densité LDL-R : Récepteur des lipoprotéines de faible densité LIST: Ligand-Induced Slow Transition, modèle d'activation d'HK4 LT CD4+ : Lymphocyte T Helper LVPs : Lipo-viro-particules MDA-5: Melanoma Differentiation-Associated 5 MFI : Intensité de Fluorescence moyenne **MODY** : Maturity Onset Diabetes of the Young **MOI** : Multiplicity of Infection NAG : N-acétylglucosamine NASH : Stétohépatite non-alcoolique **NS** : Non structurales NLR : Normalized Luminescence Ratio NLS : Signal de localisation nucléaire N2H : NanoLuc two-hybrid **OAS** : Oligoadénylate synthase **ORO**: Oil Red O **PAMP**: Motifs moléculaires associés aux pathogènes **PCA**: Protein Complementation Assay **PFA**: Paraformaldéhyde **PFK**: Phosphofructokinase **PK**: Pyruvate Kinase **PNDM :** Permanent Neonatal Diabetes Milletus

<u>PNH</u>: Primates Non-Humains

PRR : Pattern-Recognition Receptor

<u>qPCR</u> : Quantitative Polymerase Chain Reaction

<u>RE(R)</u>: Réticulum Endoplasmique (Rugueux)

RIG-I: Retinoic-acid Inducible Gene I

rLuc: Rénilla Luciférase

rSg: Réplicon Subgénomique

<u>RT</u>: Reverse transcription

<u>SGLT</u>: Sodium-glucose linked transporters

Senseur de glucose : ensemble des cellules ou molécules dont l'activité est directement

corrélée aux changements de concentration en glucose.

SIRNA : ARN interférant

SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

SR-BI : Scavenger Receptor class B type I, Récepteur aux lipoprotéines de haute densité

TA : Température ambiante

TGN : Réseau trans-golgien

TGs: Triglycérides

TLR : Toll-Like Receptor

<u>ULR</u>: Unité de Luminescence Relative

<u>UTP</u>: Uridine-triphosphate

VDAC : Voltage Dependant Anion Channel

WNV : Virus West Nile

Introduction

Les gens vous jugent par les apparences... les moustiques vous aiment comme vous êtes !

1 Chapitre 1 : Le Métabolisme Central du Carbone

Les virus ne sont pas des entités biologiques capables de se reproduire de façon autonome. Ils utilisent obligatoirement leurs hôtes cellulaires à la fois comme fournisseurs d'énergie et de l'ensemble des molécules permettant la réplication virale. Les cellules deviennent alors les lieux de synthèse et d'assemblage de nouveaux virions ou véritables usines de réplication, pouvant concentrer en un microenvironnement intracellulaire spécifique, les réactions de biosynthèse permettant la genèse de nouveaux virions.

8 Ainsi, tous les virus utilisent et détournent de nombreuses fonctions cellulaires à 9 chaque phase de leur cycle de réplication depuis l'infection à proprement parler jusqu'à la 10 sécrétion et maturation des nouvelles particules virales. Les virus reposent donc sur le 11 fonctionnement des cellules pour les pénétrer et ainsi initier leur infection. Par exemple, dans 12 le cas de virus enveloppés, les virus peuvent profiter des mécanismes de reconnaissances par 13 des récepteurs exprimés à la surface des cellules et du processus d'endocytose pour pénétrer 14 dans une cellule cible. Les virus « nus » peuvent également détourner le processus de 15 phagocytose pour pénétrer la cellule, ce processus consistant physiologiquement en 16 l'internalisation de particules extracellulaires pour leur élimination (comme l'internalisation 17 de bactéries pathogènes dans des cellules macrophagiques afin de l'éliminer). Les virus 18 peuvent ensuite détourner des processus cellulaires pour être libérés dans le cytosol. Ils 19 peuvent utiliser entre autre la voie d'acidification lysosomale pour pouvoir être libérés dans le 20 cytoplasme de la cellule. Enfin, pour certains virus enveloppés, ils vont constituer grâce aux 21 membranes des cellules infectées, des néo-particules virales matures douées de capacités 22 infectieuses. Par exemple l'utilisation des lipides intracellulaires et le passage de la particule 23 au travers du réseau trans-golgien (TGN) permet au virus de s'approprier une enveloppe 24 membranaire virale mature originaire de la cellule hôte et devient alors capable d'infecter de 25 nouvelles cellules.

26

Les virus utilisent et détournent également l'énergie que les cellules produisent pour leur fonctionnement. On parle de détournement du métabolisme cellulaire. Le métabolisme cellulaire global correspond à un ensemble de réactions hyper-connectées les unes aux autres, organisées en voies, finement régulées et constituant un réseau. L'ensemble de ce réseau a pour but de synthétiser des blocs moléculaires et produire de l'énergie afin de permettre à une cellule de se maintenir, d'assurer ses fonctions, croître et/ou proliférer. Au sein de ce super33 réseau, la glycolyse tient une place capitale et constitue un point de départ de multiples voies 34 métaboliques. Même si l'alimentation des mammifères contient de nombreuses sources 35 différentes de carbone (majoritairement glucose, fructose et galactose), les sucres sont tous 36 utilisés et recyclés pour atteindre des valeurs dans la circulation systémique proche de zéro 37 grâce au système porte hépatique. Seul le glucose est maintenu à des taux proches de 5mM 38 dans le sang. Par ailleurs, la conservation du rôle pivot du glucose au cours de l'évolution et 39 dans l'ensemble des règnes des espèces en font un élément métabolique essentiel et son 40 métabolisme un sujet d'étude de première importance pour tous travaux sur le métabolisme 41 cellulaire.

42

43 Physiologiquement, outre son rôle dans la génération d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine-triphosphate) via la glycolyse puis le cycle de Krebs, le glucose peut également 44 45 être à l'origine d'intermédiaires glycolytiques principalement le glucose-6-phosphate pour générer, par la voie des pentoses phosphates, du NADPH, des nucléotides et autres 46 47 précurseurs nécessaires à la synthèse d'acides nucléiques. Le glucose pourra aussi être stocké, 48 en cas d'excès, sous forme de glycogène (chez les mammifères) ou d'amidon (pour les 49 végétaux) afin d'être utilisé ultérieurement. Tous les virus dépendent des cellules hôtes pour 50 leur réplication et manipulent le métabolisme pour favoriser leur réplication et assemblage. 51 Par analogie avec les changements métaboliques observés dans les cellules cancéreuses, 52 l'infection virale provoque des altérations du métabolisme semblable dans les cellules 53 infectées. Les changements métaboliques observés au cours de la transformation des cellules 54 saines en cellules cancéreuses ont été caractérisés, plus précocement que ceux observés dans 55 le cas d'infection virale, par Otto Warburg dès 1926 (Warburg, 1925). Ces travaux ont 56 notamment montré que les cellules cancéreuses consommaient plus de glucose que des 57 cellules saines et que la transformation du pyruvate en ATP par phosphorylation oxydative, 58 processus physiologiquement observé dans des cellules saines, était altéré. Le glucose est 59 utilisé par la glycolyse pour y être transformé en lactate malgré la présence d'oxygène. Globalement, les virus vont promouvoir les réactions anaboliques de génération de 60 61 macromolécules et d'énergie en augmentant la glycolyse mais aussi l'utilisation des autres 62 nutriments disponibles dont l'utilisation et le devenir sont réorientés vers la réplication du 63 virus. L'augmentation de biogenèse des nucléotides et de synthèse lipidique sont également 64 deux autres voies métaboliques majoritairement affectées et modifiées par l'infection virale 65 (figure 1) (Thaker et al., 2019).



<u>Figure 1:</u> Principales voies métaboliques induites par les virus (Traduit d'après
 (Thaker et al., 2019)).

68 Les virus perturbent de nombreuses voies de signalisation de l'hôte cellulaire. La glycolyse reste la

69 voie la plus perturbée et détournée par les virus en induisant un effet « Warburg-like » qui se traduit

70 par une augmentation de la consommation de glucose et de la sécrétion de lactate. D'autres voies

71 métaboliques seront détournées par les virus dont celle de la biogenèse des lipides, particulièrement

72 *importante pour le DENV.*

ADWT, adénovirus, DENV, virus de la dengue, EBV, virus Epstein-Barr, Flu, virus de la grippe,
HBV,virus de l'hépatite B, HCMV, cytomégalovirus humain, HCV, virus de l'hépatite C, HPV, virus
de papillomes humains, HSV-1, virus herpès-simplex 1, HTLV-1, herpèsvirus associé au sarcome de

76 Kaposi, MCPyV, polyomavirus à cellules de Merkel, WSSV, virus du syndrôme des tâches blanches,

77 ZIKV, virus Zika.

78

Néanmoins, même si de nombreux virus induisent une augmentation de la voie glycolytique, des changements d'autres voies métaboliques seront plus spécifiques à chaque type de virus mais aussi pour un virus donné, pourront être différents suivant le type cellulaire infecté comme la voie de l'acide citrique, la voie de dégradation, synthèse et transport des lipides ou encore la voie de biosynthèse des pyrimidines nucléotidiques (Thaker et al., 2019). 84

I. La glycolyse

85

La glycolyse aussi appelée la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas permet l'assimilation du glucose dans le but de produire de l'énergie suite à l'entrée de son produit, le pyruvate, dans le cycle de Krebs. Elle a lieu exclusivement dans le cytoplasme cellulaire.

- 89 Il existe deux types de glycolyse :
- 90 La glycolyse aérobie, qui se déroule comme son nom l'indique, en présence
 91 d'oxygène

92 - La glycolyse anaérobie, qui à l'inverse se déroule sans oxygène.

Le bilan moléculaire et énergétique de ces deux types de glycolyse n'est pas le même. En effet, dans le cas d'une réaction en présence d'oxygène, le glucose permettra la génération de deux molécules d'ATP, de deux molécules de NADH,H+ ainsi que deux molécules de pyruvate. Alors que les molécules d'ATP générées pourront directement être utilisées comme source d'énergie, le NADH,H+ devra être oxydé pour permettre la génération du cofacteur NAD+. Enfin, le pyruvate pourra être utilisé dans le cycle de Krebs mitochondrial pour générer de l'acétyl-CoA qui sera finalement dégradé en CO₂ et H₂O.

Dans le cas d'une réaction menée en absence d'O₂, les produits finaux de la glycolyse seront les mêmes : deux molécules d'ATP, deux molécules de NADH,H+ et deux molécules de pyruvate. Néanmoins, dû à l'absence d'O₂, le devenir du NADH,H+ ne sera pas le même et le pyruvate sera alors transformé en lactate via la voie de la fermentation lactique (comme par exemple dans des muscles striés en situation d'hypoxie) ou bien en éthanol via la fermentation alcoolique (principe des levures de bières).

106

107 Comme nous l'avons expliqué précédemment, les virus ne sont pas des entités 108 biologiques vivantes à proprement parler et doivent ainsi obligatoirement utiliser la 109 machinerie et le métabolisme cellulaire pour se répliquer et se disséminer dans un organisme. 110 De nombreuses études portant sur diverses catégories de virus ont déjà montré un 111 détournement des voies métaboliques par les virus et notamment des voies de la glycolyse et 112 de synthèse des nucléotides. La plupart des virus induisent (comme dans les cellules 113 tumorales) une glycolyse dite aérobie se traduisant par une production de lactate sécrété à 114 l'extérieur de la cellule grâce aux transporteurs de monocarboxylate malgré la présence 115 d'oxygène. Ce phénomène, appelé aussi effet Warburg, se traduit par une consommation 116 accrue de glucose et une production plus rapide, mais aussi moins efficace que le cycle de 117 Krebs, d'ATP. Alors que dans les cellules cancéreuses cet effet permet de produire plus de 118 biomasse, pour les cellules infectées il permet d'avoir non seulement une source rapide et 119 importante d'ATP mais aussi d'activer l'ensemble des voies de biosynthèses pour permettre 120 la réplication virale.

121 En outre, le glucose dans des cellules infectées jouerait également un rôle 122 anaplérotique dans d'autres voies métaboliques. En d'autres termes, au lieu d'être utilisé 123 comme normalement pour produire de l'énergie via la phosphorylation oxydative, le glucose 124 ou ses produits dérivés sont utilisés comme substrats dans d'autres voies métaboliques 125 comme la voie de la néo-lipogénèse. Cette voie est particulièrement importante pour de 126 nombreux virus pour leur réplication et notamment pour le virus de la Dengue (DENV). Ce 127 mécanisme sera plus spécifiquement décrit au paragraphe suivant concernant le métabolisme 128 lipidique et le développement d'une pathologie virale.

129

1) L'entrée du glucose dans la cellule

130

Le glucose est un glucide doté de six atomes de carbone et hydrophile, il ne peut donc pénétrer dans la cellule en traversant la membrane plasmique par diffusion simple. Mais le glucose est vital pour toutes les cellules du corps. Aussi, les cellules ont à leur disposition deux moyens pour faire entrer ce glucose :

- 135 des transporteurs spécifiques au glucose : les protéines GLUT (pour *GLUcose* 136 *Transporters*)
- un système de co-transport en utilisant le transport d'ions Na+ : les protéines SGLTs
 (pour *Sodium-glucose linked transporters*).

Outre le transport du glucose, ces transporteurs assurent le transport d'autres hexoses mais
également de myo-inositol, d'acide urique, de glucosamine et d'ascorbate.

141

A- Les protéines GLUTs

142

Les protéines GLUTs sont des protéines membranaires permettant le transport du glucose du milieu extracellulaire vers le cytoplasme cellulaire. Elles forment une famille de 145 14 protéines (de GLUT1 à GLUT14) d'environ 500 acides aminés (AA) subdivisées en trois classes en fonction de leur pourcentage d'homologie de séquence (entre 28 et 65%) par 147 rapport au gène codant la protéine GLUT1. La classe I regroupe les GLUT1 à 4. La classe II

- 148 regroupe GLUT5, GLUT7, GLUT9 et GLUT11. Enfin, la classe III regroupe GLUT6,
- 149 GLUT8, GLUT10, GLUT12 et GLUT13 (Navale and Paranjape, 2016).
- 150 Structurellement, ces protéines comportent 12 domaines trans-membranaires et leurs
- 151 domaines N et C terminaux sont orientés vers le compartiment intracellulaire (figure 2).



Milieu extracellulaire

152 **Figure 2 :** Schéma d'une protéine GLUT.

La protéine GLUT se présente sous la forme d'un enchaînement de séquences intra et extra cellulaires
séparées par 12 régions transmembranaires. Les extrémités N et C terminales des protéines GLUT

155 sont orientées vers les compartiments intracellulaires.

156

Malgré une certaine homologie de séquence, chaque isoforme possède des
caractéristiques spécifiques, nécessaires aux fonctions de la cellule où il est exprimé.
Certaines de ces isoformes ont une activité insulino-dépendante comme notamment GLUT4
(figure 3) (Bryant et al., 2002).



161 <u>Figure 3 :</u> Contrôle de la translocation à la membrane de GLUT4 par l'insuline chez 162 l'homme.

Suite à la fixation de l'insuline sur son récepteur, la transduction du signal permet le transport du
transporteur GLUT4 depuis les organelles intracellulaires vers la membrane plasmique des cellules.
La proportion de transporteurs à la membrane plasmique augmente, facilitant ainsi l'entrée de

166 molécules de glucose dans la cellule.

167

Dans le foie, le transport du glucose est assuré par l'isoforme 2 des protéines GLUTs. Ce transport est rapide et régulé par l'activité de la glucokinase (GCK, autre nom de l'hexokinase 4). Chez l'homme, GLUT2 est tellement actif (activité 20 à 50 fois supérieure à celle d'HK4) que très rapidement la concentration intracellulaire en glucose est la même que celle au niveau systémique (De Vos et al., 1995; Gould and Bell, 1990).

Catágoria	Type de CLUT	Organe	Fonction au sein	Substrat/affinitá
Categorie	Type de GLUT	d'expression	d'une cellule	Substrat/affinite
		Cellules β pancréas, foie,	Transport bidirectionnel du glucose dépend des hormones (thyroïdes)	Forte affinité et
				préférence pour
				le glucose mais
				capable de
	GLUT1			transporter
	GLUIT	érythrocytes,		mannose,
		placenta, cerveau		galactose,
				glucosamine et
				ascorbate sous
				forme réduite
			- Foie : transport	Faible affinité
		Foie	bidirectionnel du	pour le glucose,
		(majoritaire),	glucose	le mannose, le
	GLUT2	reins, cellules	(assimilation et	galactose et le
Transporteurs		intestinales, cellules β pancréas et certains neurones	rejet),	fructose mais
de classe I			transporteur sous l'effet de l'insuline - Rein : absorption	capacité forte ;
				forte affinité
				pour la
			du glucose en	glucosamine
			basolatéral	
		Cerveau,	- Transport	
	GLUT3	leucocytes et	intracellulaire de	Forte affinité
	OLU15	cellules β	glucose	pour le glucose
		pancréas		
			- Transport	
		Cœur cerveau	intracellulaire de	
	GLUT4	muscles	glucose sous	
		squelettiques et tissus adipeux	contrôle de	/
			l'insuline	/
			(translocation à la	
			membrane	

			plasmique et	
			augmentation de	
			10 à 20 fois la	
			proportion de	
			GLUT)	
	GLUT14	Testicules	/	/
		Intestin grêle,		Transporteur du
	GLUT5	testicules,		fructose à faible
		cerveau,		affinité
		muscles	/	
		squelettiques et		
		reins		
		Intestin grêle,		Forte affinité
	GLUT7	testicules, colon	/	pour le glucose
		et prostate		et le fructose
		Reins, foie,	Transport	Forte affinité
	GLUT9	placenta,	dépendant du	pour l'acide
	(multiples	intestins,	potentiel de	urique
Transporteurs	isoformes)	leucocytes et	membrane	
de classe II		chondrocytes		
		- GLUT11A :		Forte affinité
		cœur, muscles		pour le glucose
		squelettiques, et		et le fructose
		reins		42% homologie
	GLUT11	- GLUT11B :		avec GLUT5
	(3 isoformes	placenta, tissus		
	GLUT11A,B et	adipeux, reins	/	
	C)	- GLUT11C :		
		tissus adipeux,		
		cœur, muscles		
		squelettiques et		
		pancréas		
Transporteurs	GLUT6	Cerveau, rate et	Localisation	Faible affinité

de classe III		leucocytes	intra-	pour le glucose
			cytoplasmique et	
			translocation	
			membranaire	
			dépendante des	
			hormones (hors	
			insuline)	
			Facilite le	Forte affinité
			transport des	pour le glucose
			sucres à travers la	et transport
			membrane de	compétitif avec
			différents	le fructose et le
		Testimulas	organelles	galactose
		l esticules	cellulaires	
		(majoritaire),	(mitochondries,	
	GLUT8 (ou GLUTX1)	cerveau, glandes surrénales, foie, rate, tissus adipeux bruns et poumons	réticulum	
			endoplasmique ou	
			lysosomes)	
			Localisation	
			intra-	
			cytoplasmique et	
			translocation	
			membranaire	
			dépendante des	
			hormones (hors	
			insuline)	
	GLUT10	Cerveau,		
		muscles		
		squelettiques,		
		cœur, poumons,	/	/
		placenta, foie,		
		reins et		
		pancréas		

			Localisation	Homologie de
	GLUT12	Intestin grêle,	intra-	séquence avec
		tissus adipeux,	cytoplasmique,	GLUT10 mais
		placenta et	translocation	son activité
		muscles	membranaire	ressemble plus à
		squelettiques.	dépendante de	celle de GLUT4
			l'insuline	
			Localisation	Différent des
	GLUT13 (ou HMIT)	Tissus adipeux, reins et cerveau	intra-	autres GLUTs, il
			cytoplasmique,	assure le
			translocation	transport de
			membranaire	l'inositol-3-
			suite à la	phosphate
			dépolarisation ou	
			par activation de	
			la protéine C	

173 <u>Tableau 1 :</u> Récapitulatif des différents transporteurs GLUTs, leurs sites d'expression et 174 affinités pour leurs substrats (D'après (Navale and Paranjape, 2016)).

175

B- Le co-transport

176

177 Ce système de transport est un transport actif c'est à dire qu'il nécessite de l'énergie
178 pour pouvoir se réaliser car le glucose va être transporté contre son gradient de concentration.
179 Souvent, le glucose profite du transport d'ions Na+ vers l'intérieur de la cellule pour pouvoir
180 y pénétrer en même temps.

Pour ce faire, ce transport utilise les protéines SGLTs. Ces protéines, de 60 à 80kDa, constituent une superfamille de six protéines en fonction de l'organe où elles sont exprimées, de leur l'affinité avec le glucose et de leur fonction dans l'organisme (**tableau 2**). Elles contiennent entre 580 et 718 AA s'organisant en 14 domaines transmembranaires dont les extrémités N et C terminales s'orientent vers l'espace extracellulaire. Elles n'utilisent pas directement l'ATP mais leur activité repose néanmoins sur le gradient de concentration sodium-potassium généré par l'activité ATPase.

Type de SCI T	Organe	Fonction au sein	Substrat/affinitá	
Type de SOLT	d'expression	d'une cellule	Substrat/ammite	
	Intestin grêle et reins		Forte affinité pour le	
SCI T1		Absorption de	glucose mais faible	
SOLT		glucose	capacité dans les	
			reins	
	Reins	Absorption de	Faible affinité pour	
SGLT2		glucose	le glucose mais forte	
		giucosc	capacité	
		Senseur du glucose		
	Intestins, testicules, utérus, poumons, cerveau et glande thyroïde	contrôlant les		
		niveaux de glycémie		
SGLT3		dans le cerveau et le	/	
		système digestif mais		
		ne transporte pas le		
		glucose		
	Intestins, reins, foie,	Absorption du		
SGLT4	cerveau, poumons,	mannose, fructose et	Faible affinité	
	utérus et pancréas	glucose		
SGLT5	Reins	Transport du glucose	/	
	ixeniis	et du galactose	,	
	Cerveau, reins et intestins	Absorption du D- chiro-inositol et	Forte affinité pour le	
SGLT6			myo-inositol et faible	
SULTU			affinité pour le	
		Brucose	glucose	

188 <u>Tableau 2 :</u> Récapitulatif des différents transporteurs SGLTs, leurs sites d'expression et 189 affinités pour leurs substrats (D'après (Navale and Paranjape, 2016)).

- 190 **2)** Réactions de la glycolyse
- 191

La glycolyse est un ensemble de réactions métaboliques de catabolisme du glucose
afin de produire de l'énergie et a lieu dans toutes les cellules eucaryotes. Elle se déroule en 10
réactions enzymatiques successives que l'on peut organiser en deux grandes parties :

- 195 une première partie, consommatrice d'ATP qui servira à métaboliser les hexoses pour 196 permettre la production de glycéraldéhyde-3-phosphate,
- 197
- une seconde partie, productrice de deux ATP, deux molécules de pyruvate et d'une 198 molécule de NADH,H+ suite à l'oxydation du produit de la première partie.

199 La présence de produits à l'état phosphorylé est un moyen pour la cellule de maintenir ces 200 produits alors chargés négativement à l'intérieur de la cellule en les empêchant de ressortir 201 par diffusion simple. Par ailleurs, la présence de ces phosphates facilite la reconnaissance du 202 substrat par l'enzyme de l'étape suivante et permet de conserver l'énergie pour permettre la 203 synthèse d'ATP au cours de la glycolyse.

- 204
- A- Phase consommatrice d'énergie de la glycolyse
- 205

206 La phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate est la première étape de la 207 glycolyse. Suite à son entrée dans la cellule, le glucose est immédiatement phosphorylé par 208 l'hexokinase (HK) en glucose-6-phosphate (Wilson, 1995). La réaction enzymatique 209 consomme une molécule d'ATP et est irréversible. Le glucose-6-phosphate est ensuite 210 isomérisé en fructose-6-phosphate. Cette réaction réversible est catalysée par la 211 phosphoglucoisomérase. Il n'y a pas de consommation d'ATP ou d'autres cofacteurs à cette 212 étape. Le fructose-6-phosphate va ensuite subir une phosphorylation irréversible par la 213 phosphofructokinase 1 (PFK) en fructose-1,6-bisphosphate. Comme il s'agit de l'ajout d'un 214 phosphate, la réaction consomme une molécule d'ATP (ou UTP ou ITP). Le produit 215 biphosphaté est alors clivé de manière réversible par la fructose-1,6-biphosphate aldolase en 216 glycéraldéhyde-3-phosphate et dihydroxyacétone-3-phosphate. Le dihydroxyacétone-3-217 phosphate ne peut être utilisé sous cette forme pour la suite des réactions. Il subit alors une 218 étape de conversion en glycéraldéhyde-3-phosphate grâce à la phosphotriose isomérase. Cette 219 étape marque la fin de la première phase de la glycolyse.

- 220
- 221

B- Phase de production d'ATP, pyruvate et de cofacteur NADH,H+

222 Le glycéraldéhyde-3-phosphate, produit lors de la dernière réaction de la phase 223 consommatrice d'énergie de la glycolyse, est oxydé. La réaction est catalysée par la 224 glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase portant une fonction thiol au niveau du site 225 catalytique. Il y a alors génération d'une molécule de 1,3-bisphosphoglycérate. L'énergie 226 excédentaire est récupérée par le cofacteur NAD+ qui est alors réduit en NADH,H+. La 3-
227 phosphoglycérate kinase permet ensuite, via son activité de phosphotransférase, le transfert 228 d'un phosphate du 1,3-bisphosphoglycérate vers une molécule d'ADP permettant la 229 génération d'une molécule d'ATP et d'un 3-phosphoglycérate. Par réaction réversible, la phosphoglycérate mutase assure le déplacement du groupement phosphate de la position 3 230 231 vers 2 sur la molécule de glycérate. Le 2-phosphoglycérate est alors déshydraté grâce à 232 l'énolase ce qui va générer la molécule la plus énergétique de la cellule. Cette molécule très 233 énergétique, le 2-phosphoglycérate, va ensuite voir son groupement phosphate transféré vers 234 une molécule d'ADP pour la génération d'un ATP. La réaction est catalysée par la pyruvate 235 kinase (PK). Le produit pyruvate est alors formé et prêt à entrer dans le cycle de Krebs.

236

C- Bilan énergétique de la glycolyse

237

Lors de la première phase de la glycolyse, pour une molécule de glucose consommée, il y a eu également consommation de deux molécules d'ATP et la production de deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate. L'utilisation d'une molécule de glycéraldéhyde permet la production de deux molécules d'ATP, d'une molécule de pyruvate et d'un NADH,H+.

Ainsi à partir d'un glucose il y a donc génération de deux molécules d'ATP, deux NADH,H+
ainsi que deux molécules de pyruvate.

En fonction de l'état énergétique et du mode glycolytique de la cellule (consommation ou non
d'oxygène), le devenir du pyruvate sera différent :

- En présence d'une consommation d'oxygène, le pyruvate sera oxydé grâce au cycle de
 Krebs mitochondrial,
- A l'inverse, dans un microenvironnement hypoxique et en absence de phosphorylation
 oxydative, le pyruvate sera converti en lactate.

En conditions non-hypoxiques, il y a une coordination entre les premières étapes de phosphorylation et de terminaison de l'utilisation du glucose avec la phosphorylation oxydative mitochondriale pour permettre une totale réduction du glucose tout en empêchant la génération de lactate qui serait toxique pour la cellule (BeltrandelRio and Wilson, 1992; Marie and Bralet, 1991). 256 257

D- Les enzymes de la glycolyse

258 Comme nous venons de le voir au paragraphe précédent, les réactions métaboliques 259 comme celles de la glycolyse sont catalysées par plusieurs enzymes. Elles assurent la 260 transformation d'un substrat en un produit. Trois réactions enzymatiques de la glycolyse sont 261 dites irréversibles en raison de la variation d'énergie libre ΔG fortement négative qui les 262 caractérise (hexokinase, phosphofructokinase et pyruvate kinase). La réalisation inverse de 263 ces trois réactions qui permet la néoglucogénèse est possible grâce à d'autres enzymes 264 spécifiques. L'irréversibilité d'autres étapes est probablement plus liée à l'indisponibilité en 265 substrats nécessaires à la réalisation en réaction inverse qu'à l'incapacité de l'enzyme à 266 réaliser la réaction en sens inverse.

267

3) Les HKs, les premières enzymes de la glycolyse

- 269

268

A- Structures des HKs

270 Les HKs sont les premières enzymes intervenant dans la transformation du glucose au 271 cours de la glycolyse. Elles constituent une étape clé de cette voie catabolique car elles 272 assurent la conversion du glucose en glucose-6-phosphate. Ce glucose-6-phosphate peut 273 ensuite être utilisé par différentes voies métaboliques (figure 4) dont la glycolyse, la voie des 274 pentoses-phosphate ou encore la biogenèse de lipides suivant le tissu considéré. Le glucose 275 n'est pas le seul sucre métabolisable par les HKs : leur activité est peu spécifique et de 276 nombreux hexoses comme le mannose et le fructose sont phosphorylables par l'HK (Cardenas 277 et al., 1984a; Xu et al., 1995; Xu et al., 1994). Ils sont ensuite, comme le glucose, incorporés 278 comme substrats d'autres voies métaboliques (Cardenas et al., 1998; Wilson, 1995).



279 <u>Figure 4 :</u> Le devenir du glucose-6-phosphate dans les cellules (Traduit de (Wilson,
280 2003)).

Le glucose-6-phosphate généré par phosphorylation du glucose par l'HK pourra être incoporé dans différentes voies de biosynthèse suivant l'état énergétique de la cellule. En cas d'hypoglycémie, le glucose-6-phosphate sera utilisé pour produire de l'énergie par glycolyse puis par phosphorylation oxydative via le fonctionnement du cycle de Krebs. Il pourra être également utilisé dans la voie des pentoses-phosphate pour générer des nucléotides et des cofacteurs. Dans certains tissus et en cas d'hyperglycémie, il sera stocké sous forme de glycogène.

287

288 Découvertes dans les années 60, il existe quatre formes d'HK (numérotées de 1 à 4) 289 différemment exprimées au sein des tissus de l'organisme de nombreux mammifères dont 290 l'homme (Gonzalez et al., 1964; Katzen and Schimke, 1965). Il s'agit d'ailleurs, 291 d'isoenzymes plutôt que d'isoformes car 4 gènes sont à l'origine de ces 4 formes 292 d'hexokinase. L'isoenzyme 1 est ubiquitaire et retrouvé dans la plupart des tissus de 293 l'organisme avec une prépondérance au niveau du cerveau, des érythrocytes et des reins 294 (Crane and Sols, 1953; Wilson, 1995). L'isoenzyme 2 est exprimé dans les tissus adipeux, les 295 muscles squelettiques ainsi que dans les glandes mammaires (Pedersen et al., 2002). 296 L'isoenzyme 3 se retrouve dans les tissus splénique et hépatique. Enfin, l'isoenzyme 4 est 297 notamment spécifiquement exprimé au niveau des cellules pancréatiques et hépatiques (Postic 298 et al., 2001). Cette dernière forme sera d'un grand intérêt pour la suite de cet exposé car nous 299 utiliserons des cellules issues de lignées hépatocytaires pour réaliser notre étude.

Des analyses des séquences génétiques codantes pour ces différentes formes de l'enzyme HK montrent clairement l'existence d'un gène ancestral commun codant au moins les formes 1, 2 et 3 d'HK. Ce gène coderait pour une protéine de 50 kDa à 465 AA dont la duplication du gène puis l'évolution seraient à l'origine des autres formes d'HK (1, 2 et 3), enchaînement de 918 AA pour 100 kDa avec 2 domaines similaires. Seule la forme 2 aurait conservé une activité catalytique au niveau des deux domaines de l'enzyme (N et C terminales) (Tsai and Wilson, 1996) alors que pour les formes 1 et 3, l'un des domaine (la
partie N terminale) serait devenue un domaine régulateur (Arora et al., 1993; Sui and Wilson,
1997; Tsai, 1999; White and Wilson, 1989).

309 Le domaine N terminal de l'HK permet la liaison avec la mitochondrie par interaction 310 avec la porine mitochondriale. L'HK ne peut alors plus former de poche catalytique par 311 rapprochement avec le domaine C terminal : le produit de l'HK n'est alors plus retenu et le 312 site catalytique est plus rapidement de nouveau disponible pour une nouvelle réaction. Ceci 313 explique que l'activité de l'enzyme est plus élevée lorsque celle-ci est liée aux mitochondries 314 que lorsqu'elle est dans sa forme libre. Par son association à la mitochondrie, elle serait 315 également moins accessible aux protéases cellulaires permettant ainsi l'augmentation de sa 316 demi-vie tout en réduisant son turn-over (Pedersen et al., 2002).

Dans le cas de l'isoenzyme 3, il n'y a pas de séquence d'adressage à la mitochondrie,
néanmoins des études ont montré qu'outre sa présence cytoplasmique, cet isoenzyme était
également détecté en périphérie du noyau cellulaire malgré l'absence d'un signal d'adressage
nucléaire clair (Preller and Wilson, 1992).

321 De plus, les différents états des HKs, libres dans le cytoplasme ou alors liées aux 322 porines mitochondriales, influencent leur activité. Les formes associées aux mitochondries 323 sont plus actives car elles ont accès plus facilement aux molécules d'ATP néosynthétisées, 324 l'ATP constituant un cofacteur nécessaire à leur fonctionnement. La fixation au niveau des 325 porines mitochondriales (aussi appelées les VDAC pour Voltage Dependent Anion Channel), 326 permet un accès privilégié au cofacteur ATP : les protéines VDAC assurant le transport entre 327 la mitochondrie et le cytosol de molécules chargées négativement comme l'ATP ou l'ADP 328 (Arora and Pedersen, 1988). Plus précisément, les HK se fixent préférentiellement aux 329 porines associées aux zones de contacts entre les membranes externe et interne de la 330 mitochondrie (BeltrandelRio and Wilson, 1992; Dorbani et al., 1987; Kottke et al., 1988).

Au niveau moléculaire, l'adressage mitochondrial de ces HK est permis grâce à une séquence, proche d'un peptide signal, située dans la partie N-terminale de la protéine. Cette séquence hydrophobe interagit spécifiquement avec la membrane externe de la mitochondrie (Bryan and Raisch, 2015; Sui and Wilson, 1997). Seules les formes 1 et 2 des HK en sont dotées expliquant l'absence de fixation de HK3 sur la mitochondrie (Wilson, 2003). L'isoenzyme 4 ne peut être adressé ni à la mitochondrie ni au noyau (hormis s'il interagit

39

337 avec sa protéine régulatrice comme expliqué au paragraphe 6 de cette partie : Régulation par338 GKRP).

339 Des modifications des taux d'expression des différentes isoenzymes d'HK et ainsi 340 donc de leur localisation subcellulaire sont observées dans le cas de cancers et seraient l'une 341 des explications de l'effet Warburg. Par exemple, il est décrit que dans de nombreux cancers 342 que l'HK1 devient l'HK majoritairement exprimée et que dans des lignées tumorales entre 50 343 et 70% de cette enzyme sont associés aux mitochondries et donc plus actifs. Dans les formes 344 sévères d'hépatocarcinomes, il y a transformation quantitative et qualitative de l'HK : l'HK4 345 normalement exprimée spécifiquement dans le foie est alors remplacée par l'HK2 qui y est 346 très fortement exprimée (DeWaal et al., 2018; Patra et al., 2013; Wolf et al., 2011).

Pour ce qui est de la forme 4 d'HK son origine ainsi que la relation par rapport aux autres membres de la famille des HKs semblent encore aujourd'hui incertaines. Deux modèles d'évolution ont ainsi été proposés dans les années 80 par Ureta : le premier propose que la duplication du gène ancestral d'HK aurait eu lieu avant la divergence et la délétion du domaine N terminale d'HK4 (**Figure 5, gauche**) alors que le second propose une divergence précoce du gène d'HK4 avant la duplication du gène de base d'HK (**Figure 5, droite**) (Ureta, 1982).



354 <u>Figure 5 :</u> Modèles d'évolution ayant conduit à l'apparition d'HK4 (Traduit et adapté 355 de (Ureta, 1982)).

Une décennie plus tard, avec l'apparition des techniques de clonages et de séquençage,
les recherches sur l'évolution phylogénétique des HKs ont permis de mieux comprendre leur

358 origine. Alors qu'en 1991, Griffin montre que l'HK4 est plus proche des autres HK de 359 mammifères, et plus précisément du domaine C terminal de ces enzymes, que des HK4 de 360 levures (Griffin et al., 1991) (se rapprochant ainsi du premier modèle d'Ureta), Cadernas et 361 son équipe montrent en 1998 par une méthode calculatoire de distances entre protéines 362 (UPGMA, Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) que les domaines N 363 terminaux des HK évoluent plus vite que ceux en C terminal (Cardenas et al., 1998). Il montre 364 ainsi qu'HK4 serait donc la divergence la plus rapide dans l'évolution des HK et que la 365 duplication du gène ancestral aurait eu lieu seulement ensuite se rapprochant ainsi du second 366 modèle proposé par Ureta.

367 Ce n'est ainsi qu'avec l'évolution du séquençage des génomes qu'un grand nombre de 368 gènes d'HK de différentes espèces de vertébrés ont pu être séquencés aboutissant à la 369 conclusion d'une part que la duplication du gène HK a eu lieu avant l'individualisation de 370 l'isoenzyme 4 des autres formes d'HK (théorie renforcée de par le fait que les séquences codantes des différentes HK sont portées par plusieurs chromosomes distincts dont la 371 372 localisation est retrouvée chez plusieurs vertébrés) et d'autre part ces études ont mis en 373 évidence l'existence d'une cinquième forme d'HK : l'HK 5 aussi appelée HKDC1 (HK 374 Domain Containg 1) (Figure 6, tableau 3) (Irwin and Tan, 2008). Cette HK a 70% 375 d'homologie avec l'isoforme HK1 et est codée par un locus adjacent au chromosome portant 376 HK1. Il proviendrait d'un phénomène de duplication en tandem après duplication et modification de l'extrémité N terminale du gène ancestral codant la séquence d'HK1. 377 378 HKDC1 contiendrait ainsi un domaine N terminal lui permettant d'assurer sa liaison avec la 379 mitochondrie mais non fonctionnel d'un point de vue enzymatique ainsi qu'un domaine C 380 terminal qui, d'après séquençage, contient l'ensemble des résidus nécessaires à la fixation du 381 glucose et de l'ATP (Irwin and Tan, 2008).



382 <u>Figure 6 :</u> Modèle d'évolution ayant conduit à l'apparition des différentes HKs proposé
383 par Irwin et Tan (Traduit de (Irwin and Tan, 2008)).

384

Elle serait exprimée majoritairement dans le petit intestin et le rein mais aussi dans le colon et le cerveau. Enfin, elle serait également retrouvée en faible quantité dans le foie (Ludvik et al., 2016). HKDC1 reste la moins connue des formes d'HK.

Ceci explique que les HKs sont malgré tout génétiquement proches avec des séquences
répétées et similaires.

Isoenzyme	Poids moléculaire et gène d'expression	Expression tissulaire	Substrats	Propriétés enzymologiques	Régulation
HK1	100kDa (deux sous- unités de 50kDa mais une seule active)	Ubiquitaire Très exprimée dans le cerveau et les reins	Hexoses	Km faible (Km≈0,1mM) Vmax élevée	Inhibition par son produit

	Chromosome				
	10q22				
НК2	100kDa (deux sous- unités de 50kDa et les deux sont actives) Chromosome 2p12	Expression dans les tissus sensibles à l'insuline : Muscles squelettiques, Glandes mammaires, Tissus adipeux	Hexoses	Km faible (Km≈0,1mM) Vmax élevée	Inhibition par son produit Régulation de son activité par l'insuline
НК3	100kDa (deux sous- unités de 50kDa mais une seule active) Chromosome 5q35.2	Rate Foie	Hexoses	Km faible (Km≈0,1mM) Vmax élevée	Inhibition par son produit
HK4 ou GCK	50kDa Chromosome 7p13	Foie Pancréas	Hexoses D-glucose uniquement pour la synthèse de glycogène	Km élevé (Km≈10mM) Vmax faible Constance de Hill à 1,5 (coopérativité positive)	Au niveau hépatique : Régulation de son activité par l'insuline, glucagon, biotine et triiodothyronine
HK5 ou HKDC1	100kDa (deux sous- unités de 50kDa mais	Foie		Très faible affinité pour le glucose	

une seule		
active)		
Chromosome		
10q22.1		

390 <u>Tableau 3 :</u> Récapitulatif des principales caractéristiques des différentes HKs (D'après
391 (Arora and Pedersen, 1988; Pedersen et al., 2002; Postic et al., 2001; Pusec et al., 2019;
392 Wilson, 1995)).

393 394

B- Le cas particulier des hépatocytes

395 Bien que le foie soit un organe aux multiples fonctions dans l'organisme (production 396 de la bile, néoglucogenèse, synthèse des lipides et détoxification de l'organisme via la 397 synthèse de l'urée), il est étroitement lié au métabolisme glucidique. Il constitue l'organe 398 majeur responsable de la clairance des carbohydrates permettant un maintien stable de la 399 glycémie grâce à de nombreuses enzymes qui agissent en synergie. Ces enzymes permettent 400 non seulement l'absorption des hexoses issus de l'alimentation mais aussi leur stockage sous 401 forme de glycogène qui sera utilisé pour synthéthiser du glucose en cas de jeûne. Elles sont 402 spécifiquement exprimées dans le foie et parmi elles, on trouve l'HK4. HK4 est une enzyme 403 cytoplasmique monomérique, qui comme les trois autres formes d'HK, est responsable de la 404 première étape limitante de la glycolyse. Elle ne contient qu'un seul site catalytique et 405 catalyse la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate, en consommant de l'ATP. De 406 façon contre-intuitive à ce que suggère son nom, cette enzyme n'est pas spécifique du glucose 407 mais, au contraire, est capable de phosphoryler plusieurs type d'hexoses (comme le fructose, 408 le mannose, le galactose, N-acetyl-glucosamine). La préférence enzymatique d'un substrat 409 plutôt qu'un autre dépendrait surtout de l'affinité (Xu et al., 1995; Zelent et al., 2008).

410 De plus, des analyses ont montré que des mutations d'HK4 conduisaient au développement de 411 pathologies dont les manifestations cliniques varient en fonction de la mutation ainsi que du 412 nombre d'allèles affectés par celle-ci. Ainsi, plus de 600 mutations différentes d'HK4 ont pu 413 être recensées avec des mutations inhibitrices ou au contraire activatrices de l'activité. Parmi 414 les mutations induisant des pertes d'activité enzymatique, certaines conduisent à l'apparition 415 d'un diabète chez des jeunes individus appelé aussi MODY (pour Maturity Onset Diabetes of 416 the Young). Suivant l'implication d'un ou deux allèles les conséquences sur l'organisme 417 seront différentes :

- 418 lorsqu'un seul allèle d'HK4 est concerné par une mutation, les conséquences sur la glycémie ne nécessitent généralement pas de thérapie
- 420 alors que, à l'inverse, lorsque les deux allèles d'HK4 seront mutés (soit par mutation
 421 commune ou par deux mutations différentes), de sévères formes de diabètes
 422 surviennent chez les nouveaux nés. On parle de PNDM (pour *Permanent Neonatal*423 *Diabetes Mellitus*) qui conduisent au décès si les patients ne sont pas rapidement
 424 traités avec de l'insuline (Froguel et al., 1993; Hattersley et al., 1992).

Pour ce qui est des mutations activatrices conduisant à des hypoglycémies, un seul
allèle sera concerné par la mutation car si les deux allèles sont affectés cela est mortel au
stade de développement fœtal (Pino et al., 2007). Nous reparlerons de ces mutations au
paragraphe I.7) de ce chapitre.

429 Des mutations dans le gène codant pour le régulateur négatif de HK4 (GKRP) ont également
430 été décrites dans ce sens. Nous parlerons de ce régulateur plus loin dans le manuscrit.

431

432 Comme dit précédemment, cette enzyme est spécifiquement exprimée dans le foie 433 mais pas uniquement car nous la retrouvons dans le pancréas, l'hypothalamus, l'intestin grêle 434 et également dans certaines cellules neuroendocrines. Un seul gène code pour la protéine HK4 435 à fonctionnalité identique (activité de kinase) mais dont l'expression tissulaire est sous le 436 contrôle de deux promoteurs spécifiques. Un premier promoteur, en amont du gène, appelé le 437 promoteur neuroendrocrine est constitutivement actif (NE-HK4-promoteur). Il permet une 438 expression d'HK4 dans les cellules endocrines (pancréas, cellules entéro-endocrines 439 intestinales et les cellules des glandes pituitaire et surrénales) et neurales. Un second 440 promoteur situé en aval du premier promoteur dont l'activation dépend de l'insuline contrôle 441 l'expression d'HK4 au niveau hépatique (HEP-HK4-promoteur) (Iynedjian, 2009). Ceci 442 explique que les séquences génétiques des deux formes d'épissage d'HK4 (neuroendocrines 443 et hépatiques) seront identiques sauf au niveau des 15 AA de la séquence N-terminale (Figure 444 7).





Séquence spécifique des cellules β et cellules hypophysaires
 Séquence spécifique des cellules hépatiques
 Séquence commune

Figure 7 : Régulation tissulaire de l'expression d'HK4 (Traduit de (Magnuson, 1992)).

445

A l'échelle systémique, HK4 joue un rôle clé dans la régulation de la glycémie. En effet, elle est connue pour être un des composants senseur du glucose plasmatique (capacité dont nous reparlerons dans le paragraphe I.7) de ce chapitre portant sur l'implication clinique des HKs) (Al-Hasani et al., 2003; Matschinsky, 1990). Au niveau pancréatique, le rôle d'HK4 est plutôt celui de senseur métabolique permettant d'adapter la sécrétion d'insuline et de glucagon par les cellules des ilôts β en fonction de la quantité de glucose dans le sang.

452 Au niveau hépatique, le rôle d'HK4 varie suivant les phases d'hypo et 453 d'hyperglycémie. Lorsqu'il y a beaucoup de glucose dans le sang, en période postprandiale 454 par exemple, HK4 est fortement active et phosphoryle le glucose. Le glucose-6-phosphate 455 généré est alors utilisé comme substrat pour la synthèse de glycogène (forme de stockage du 456 glucose). A l'inverse lorsque la concentration en glucose dans le sang diminue, en période de 457 jeûne par exemple, l'activité d'HK4 est régulée et des enzymes permettant une synthèse de 458 novo de glucose sont activées afin de ne pas entrainer une hypoglycémie à l'échelle 459 systémique.

De plus, au niveau hépatique, l'expression de l'enzyme est dépendante des hormones de
régulation de la glycémie (stimulation par l'insuline et inhibition par le glucagon) et du cAMP
et est indépendante de la concentration de glucose malgré l'exposition à de fortes variations
en concentration de glucose (1 à 25mM). A l'inverse, au niveau pancréatique, son expression

464 est directement sous le contrôle de la concentration en glucose (Iynedjian, 2009; Magnuson, 465 1990).

466

4) Le concept d'allostérie

467

468 L'analyse des comportements catalytiques des différentes isoenzymes montrent 469 qu'elles sont fonctionnellement différentes. Alors qu'HK1, HK2 et HK3 répondent à une 470 cinétique Michaelienne, voulant que plus la quantité de substrat est importante plus l'activité 471 de l'enzyme est élevée, HK4 aura un comportement assimilable à un comportement 472 allostérique, c'est-à-dire, que sa réponse à des concentrations croissantes de glucose sera de 473 type sigmoïdal. Autrement dit l'activité d'HK4 sera augmentée lorsque l'activité enzymatique 474 a déjà été amorcée.

475 Ce concept appelé allostérie avait au départ été décrit par Monod, Wyman et 476 Changeux et voulait que l'ensemble des sous-unités d'une enzyme aient la même 477 conformation et que les changements opérant sur un site enzymatique suite à la fixation d'un 478 ligand (substrat, inhibiteur ou activateur) conduisent l'ensemble des sous-unités à adopter la 479 même conformation pour leur site actif. Ainsi, dans le cas d'un substrat jouant le rôle lui-480 même d'activateur allostérique, la fixation du substrat sur un site de l'enzyme multimérique 481 provoquera un changement de conformation des autres sites vers une forme de plus forte 482 affinité (Monod et al., 1965). L'inconvénient de ce modèle est qu'il est basé sur l'hypothèse 483 que les enzymes étudiées sont polymériques autrement dit qu'elles comportent plusieurs sous-484 unités actives, ce qui n'est pas le cas pour HK4.

485

486 Néanmoins, les travaux de Gonzalez et al., ainsi que de Parry et Walker sur l'activité 487 d'HK4 semblent montrer que cette enzyme a un comportement allostérique bien qu'elle n'ait 488 qu'une seule sous-unité catalytique. Malheureusement leurs travaux sont limités par les 489 techniques d'obtention de glucokinase : celle-ci est impure et instable et peu de personnes 490 adhèrent à leur théorie et beaucoup pensent à un artefact expérimental (Gonzalez et al., 1967; 491 Parry and Walker, 1967). Rabin et Frieden se sont également intéressés à expliquer la 492 coopérativité cinétique sans avoir pour autant de coopérativité physique liée à la fixation d'un 493 ligand sur son enzyme. Ils expliquent que cela suppose l'existence de deux voies pour 494 accomplir une même réaction soit plus simplement deux conformations enzymatiques d'HK4, 495 nommées E et E', dont l'activité enzymatique serait différente. La forme E', forme initiale, 496 serait une forme de faible affinité pour le substrat. La fixation des ligands entrainerait

497 lentement une transition vers la forme E de forte affinité. Si la quantité de substrat est 498 importante, l'enzyme n'aura pas le temps de retourner en forme E' avant qu'une nouvelle 499 fixation ait lieu. A l'inverse, en cas de concentration faible en substrat, l'enzyme a le temps de 500 repasser en conformation E' avant qu'un nouveau ligand se fixe. Ainsi, les proportions de 501 chaque forme E et E' seraient variables suivant la concentration en substrat (Frieden, 1970; 502 Rabin, 1967). Ce n'est que dans les années 70 avec l'avènement des techniques de 503 chromatographie par affinité que l'HK4 a été purifiée ce qui a permis de vérifier et d'affiner 504 les résultats obtenus dans les années 60. L'équipe de Niemeyer fait alors la première 505 description de la coopérativité d'HK4 avec le glucose et confirme par chromatographie de 506 séparation en fonction de la taille qu'HK4 ne se dimérise pas lors de la fixation d'un ligand 507 (glucose ou ATP) fonctionnant ainsi bien sous forme monomèrique (Cardenas et al., 1978; 508 Niemeyer et al., 1975).

509

510 Deux modèles expliquant le comportement de coopérativité cinétique d'HK4 ont alors été
511 proposés:

- 512 Le modèle mnemonic proposé par Ricard puis affiné par Storer et Cornish-Bowden
 513 (Ricard et al., 1974; Storer and Cornish-Bowden, 1977).
- Le modèle LIST pour l'acronyme anglo-saxon *ligand-induced slow transition* (soit en français transition lente induite par un ligand) proposé par Ainslie et Neet (Ainslie et al., 1972; Cardenas et al., 1984b; Cornish-Bowden and Cardenas, 1987).
- 517

518 Dans ces modèles, la coopérativité d'HK4 est un phénomène totalement cinétique. 519 Elle suppose que HK4 existe sous deux formes appelées E et E' qui sont lentement inter-520 converties l'une en l'autre. La principale différence entre ces deux modèles réside dans 521 l'enchaînement du processus catalytique. Pour le modèle mnemonic, seul un cycle catalytique 522 est réalisable à la fois puisque la forme E n'est obtenue que lorsqu'une réaction a déjà eu lieu. 523 Pour le modèle LIST, les choses sont un peu plus compliquées car les deux formes E et E' de 524 l'enzyme peuvent faire un cycle catalytique mais avec des cinétiques différentes selon la 525 formes de l'enzyme. Avant que des preuves conformationnelles soient générées suite à 526 l'obtention de la structure cristallographique d'HK4, des expériences avaient déjà prouvé 527 l'existence de différentes formes d'HK. Premièrement, une analyse spectroscopique avait 528 montré par un système d'émission de fluorescence suite à la fixation du glucose sur HK4 que 529 cette fluorescence augmentait lentement et que la valeur de fluorescence maximale obtenue 530 dépendait de la concentration en glucose (Lin and Neet, 1990). La mise en évidence de l'existence d'un ordre de fixation des différents substrats permettant la phosphorylation du
glucose renforce l'hypothèse d'un modèle mnemonic (Gregoriou et al., 1981). Lorsque la
structure d'HK4 a été disponible, les études cristallographiques ont montré que cette enzyme
existe en réalité sous trois formes :

- 535 Une forme fermée, active et très énergétique,
- 536 Une forme ouverte,
- 537 Une forme super-ouverte, inactive et peu énergétique (Kamata et al., 2004).

538 Entre ces trois formes, de multiples formes sont associées aux phases de transitions de
539 l'enzyme disposant de caractéristiques catalytiques particulières.

Depuis ces travaux de nombreux autres travaux ont porté sur la structure de l'enzyme (Bebernitz et al., 2009; Larion and Miller, 2012; Liu et al., 2011; Mitsuya et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Takahashi et al., 2009). A l'état inactif cette enzyme se présente structurellement sous la forme de deux domaines (le grand à l'extrémité N-terminal et le petit du coté C-terminal de la protéine) reliés par une région charnière. Le changement conformationnel pour passer à la forme active est relativement lent mais continu (**Figure 8**) (Huang et al., 2013).



547 <u>Figure 8 :</u> Structure de l'hexokinase 4 (Traduit et adapté de (Huang et al., 2013)).

- 548 HK4 contient deux domaines, petit et grand, reliés par une région charnière. Seul le petit domaine est
- 549 mobile et assure la fixation du glucose et de l'ATP. Le glucose est le premier ligand d'HK4, l'ATP le
- 550 second.

551 Deux substrats sont nécessaires à l'activation de la réaction de phosphorylation par 552 HK4 : le glucose et l'ATP. Le glucose, le premier des deux à se fixer, se lie à l'enzyme alors 553 qu'elle est encore sous une conformation super-ouverte. La zone de liaison se trouve au 554 niveau d'une région charnière entre le grand et le petit domaine d'HK4. A ce stade, le glucose 555 est loin d'être à sa position finale nécessaire à la réalisation de la réaction catalytique. HK4 556 ajuste alors la position du glucose pas à pas par changement de conformations lors des 557 différentes phases de transition. Le glucose reste lié à l'enzyme tout au long des changements 558 conformationnels tant que la conformation stéréochimique ne permet pas la fixation de l'ATP. 559 Une fois qu'HK4 est sous configuration fermée avec un glucose, l'ATP peut alors se fixer et 560 la réaction chimique de phosphorylation du glucose a lieu : le phosphate de l'ATP est 561 transféré à la molécule de glucose (figure 9).



562 **Figure 9 :** Modèles cinétiques de l'hexokinase 4 (Traduit d'après (Kamata et al., 2004)).

563 HK4 existe sous trois formes fermée, ouverte et super-ouverte. La forme fermée est capable de réaliser
564 rapidement la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate. La forme ouverte est également
565 capable de réaliser la catalyse en glucose-6-phosphate mais lentement. Enfin, la forme super-ouverte
566 est inactive et incapable de réaliser de réaction catalytique.

567

La fixation du glucose sur l'HK modifie sa structure tridimensionnelle la faisant passer d'une conformation ouverte à fermée permettant le rapprochement des éléments nécessaires à la phosphorylation du glucose. Pendant un cours laps de temps qui suit cette première réaction, l'enzyme se maintient dans la conformation induite par son substrat et la 572 réaction. Si une seconde réaction doit avoir lieu dans ce temps, elle sera plus rapide car 573 l'enzyme s'est maintenue dans la conformation fermée qu'elle a adoptée (**figure 9**). C'est la 574 coopérativité. Ceci est possible si la disponibilité en substrat est très forte, c'est-à-dire une 575 concentration en glucose élevée.

576 La coopérativité d'une enzyme peut être évaluée par le coefficient de Hill autour de 577 la valeur 1. S'il est inférieur à 1 on parle d'inhibition allostérique. S'il est supérieur à 1 on 578 parle d'activation allostérique. La coopérativité d'HK4 est caractérisée par un coefficient de 579 Hill de valeur 1,7. La sensibilité maximale de l'enzyme au glucose permettant son 580 fonctionnement catalytique maximal est obtenue à partir de 8mM de glucose soit 1,44g de 581 glucose par litre de sang. Cette concentration est légèrement supérieure à celle de la glycémie 582 physiologique de sorte que lors d'une prise alimentaire, la glycémie augmentant, l'activation 583 d'HK4 soit rapidement optimale afin de réguler la glycémie (Dipietro et al., 1962; Huang et 584 al., 2013).

Ainsi, l'étude de l'activité enzymologique et des propriétés cinétiques des HKs a permis de
les séparer en deux catégories :

- 587 HK1, 2 et 3 présentent une forte affinité pour le glucose (constante Michaelienne
 588 (Km) faible) mais aussi pour l'ensemble des hexoses (fructose, mannose, galactose
 589 etc) et sont inhibées par leur produit le glucose-6-phosphate.
- L'hexokinase 4, elle, ne répond pas à une cinétique Michaelienne et présente une affinité au glucose plus faible (Km plus élevé). De plus, elle n'est pas inhibée par son produit le glucose-6-phosphate (Vinuela et al., 1963) et permettra, en cas de glycémie importante, un stockage du glucose sous forme de glycogène. Elle répond à un modèle d'allostérie enzymatique encore récemment étudié (Whittington et al., 2015).
- 595

5) L'activation alpha et béta et les conséquences sur l'allostérie

596

597 Comme nous venons de le décrire dans le paragraphe précédent, l'allostérie d'HK4 598 illustre une coopérativité particulière d'une enzyme monomérique dotée d'un seul site de 599 fixation au glucose. Même si les modèles mnemonic et LIST donnent une vision globale des 600 mécanismes catalytiques expliquant l'allostérie d'HK4, ils ne quantifient et ne donnent pas de 601 descriptions physiques précises des changements conformationnels opérant au cours des 602 différentes phases de transition.

603 Des travaux de caractérisation RMN des changements de conformations d'HK4 ont 604 permis de montrer que la fixation du glucose se fait au niveau du petit domaine et plus 605 précisément au niveau d'une boucle appelée boucle β. Son nom est lié à sa réorganisation en 606 un feuillet lors de la fixation du glucose permettant la stabilisation de ce dernier sur l'enzyme. 607 La coopérativité de l'enzyme serait gouvernée par des transitions de l'ordre de la milliseconde 608 entre des formes ordonnées et désordonnées au sein du petit domaine d'HK4. L'utilisation de 609 variants de la boucle β dont la structuration a été optimisée, a révélé que ces variants 610 disposaient d'une activité catalytique neuf fois supérieure à celle de l'HK4 sauvage et d'un 611 abaissement de leur coopérativité à 1,3 (1,7 pour la version sauvage). Ces travaux 612 relativement récents ont permis de mieux comprendre la transition allostérique lors de la 613 fixation du glucose dans le site actif. Ce mécanisme propose des altérations de structures de 614 l'enzyme HK4 uniquement au niveau de la boucle mobile β et non un réarrangement global 615 du petit domaine d'HK4. Le réarrangement au niveau de la boucle étant rapide, le turn-over 616 (vitesse de passage d'un état lié au glucose à libre et disponible pour un nouveau cycle 617 catalytique) de l'enzyme est augmenté (Larion et al., 2015; Whittington et al., 2015). Il 618 s'oppose au mécanisme classique d'activation de type α voulant que lors de la fixation du 619 glucose, l'ensemble de la structure d'HK4 est modifié lentement vers un état « glucose-lié ».

620 Ces travaux montrent également que seulement un petit nombre d'AA d'HK4 est responsable
621 du comportement allostérique de l'enzyme.

622

6) Régulation de HK4 par GKRP

623

624 Nous avons vu qu'en fonction de la concentration en glucose et donc finalement de 625 l'état de normoglycémie ou hyperglycémie (phase post-prandiale), l'affinité d'HK4 pour le 626 glucose était modifiée du fait de son changement de conformation. Mais l'HK4 dispose 627 également d'une particularité suplémentaire quant à la régulation de son activité. Au niveau 628 hépatique, elle est régulée négativement par une protéine spécifique appelée GKRP pour 629 GlucoKinase Regulatory Protein, protéine découverte en 1989 par Emile Van Schaftingen 630 (Van Schaftingen, 1989). Elle est exprimée de façon excessive (trois à quatre fois) par rapport 631 au taux d'HK4. Cette GKRP est une polyprotéine monomérique de 68 kDa qui va inhiber la 632 protéine HK4 en interagissant avec elle et en la séquestrant au noyau de la cellule, 633 l'empêchant ainsi d'exercer sa fonction dans le cytoplasme. L'interaction entre les deux protéines est dépendante du fructose : alors que le fructose-1-phosphate, provenant 634 635 directement du fructose, exerce un rôle activateur sur HK4 en cassant l'interaction entre HK4

et GKRP, le fructose-6-phosphate provenant de l'isomérisation du glucose-6-phosphate, lui,
réalise la réaction inverse en favorisant l'interaction. Il apparaît donc clairement que le
fructose intervient comme un régulateur indirect de l'activité HK (figure 10).



639 <u>Figure 10</u>: Régulation de l'association entre HK4 et GKRP (Traduit d'après
640 (Matschinsky and Wilson, 2019)).

641 L'association d'HK4 avec GKRP permet de maintenir l'enzyme en conformation ouverte et donc

642 inactive. Cette association est régulée par le fructose : le fructose-6-phosphate induit l'interaction

643 *entre les deux partenaires alors que le fructose-1-phosphate aura tendance à les dissocier.*

644

Le fructose se retrouve dans la plupart de nos aliments végétaux soit sous forme libre soit associé au glucose sous forme de saccharose. Lors d'une prise alimentaire, sa concentration sérique va alors augmenter et provoquer une augmentation de l'activité HK se traduisant par une vitesse de phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate deux à trois fois supérieure à la vitesse cinétique en période de jeûne.

Il est à noter qu'il est maintenant clairement établi qu'une alimentation excessive en fructose
et saccharose induit également une synthèse accrue de triglycérides (TGs) hépatiques pouvant
conduire, sur le long terme, au développement d'une stéatose. On attribue aujourd'hui le nom
de « maladie du soda » à cette pathologie.

- 654 7) HK4 et la clinique
- 655

Une des fonctions bien connue et plus ou moins associée à l'activité catalytique d'HK4 est son rôle de senseur du glucose assurant le maintien d'une glycémie stable. La 658 régulation de la glycémie est un processus finement régulé permettant un maintien, à jeun, des 659 taux de glucose sanguin entre 0,7 et 1g/L et toujours inférieur à 2g/L, y compris en période 660 postprandiale. Pour cela, différents organes interviennent dont le pancréas (principal organe 661 gluco-régulateur, sécréteur des hormones d'insuline et de glucagon) mais aussi les cellules 662 entéro-endocrines intestinales, les glandes surrénales et pituitaires ainsi que les cellules 663 hépatiques. Cette régulation pluri-partenariale nécessite ainsi un système de régulation 664 complexe et coordonné de façon à ce que l'ensemble des partenaires, dont les actions peuvent 665 être antagonistes, ajustent le taux de glucose sanguin dans le même sens. Plusieurs données de 666 la littérature nous indiquent qu'HK4 jouerait le rôle de senseur pour le maintien de cette 667 homéostasie (Al-Hasani et al., 2003; Matschinsky, 1990).

668 En effet, HK4 est exprimée dans les cellules hépatiques et des ilots pancréatiques (α , 669 β et δ) comme évoqué au paragraphe précédent, mais également dans l'ensemble des cellules 670 participant à la régulation de la glycémie. La perte d'expression d'HK4 induit des pertes de 671 régulation de la glycémie : au niveau pancréatique, la perte d'HK4 provoque une absence de 672 production et de sécrétion du glucagon par les cellules α et d'insuline par les cellules des ilots 673 β. Par ailleurs, ces études démontrent que tout dérèglement de cette activité d'HK4 conduit à 674 l'apparition de pathologies comme le diabète ou l'hypoglycémie. Une bonne illustration de ce 675 phénomène a été décrite chez un patient atteint d'hypoglycémie suite à un défaut de sécrétion 676 d'épinéphrine et de corticostéroïdes par la glande surrénale. Initialement traité pendant 12 ans 677 aux cortisols pour palier à ce problème, une mutation chez ce patient a été mise en évidence 678 dans le gène codant HK4 dans la glande surrénale (M197T) rendant l'enzyme trop active 679 (Morishita et al., 2017). Aujourd'hui, plus de 600 maladies dépendant de mutations d'HK4 680 ont été recensées. La plupart de ces pathologies sont liées à une perte de fonction de l'enzyme (Gloyn, 2003; Osbak et al., 2009). 681

682 Ainsi, comme précédemment expliqué, parmi ces mutations avec perte de fonction, 683 deux types majeurs de mutations ont été identifiés et caractérisés : les mutations MODY-2 684 (Maturity Onset Diabetes of the Young) et les mutations PNDM (Permanent Neonatal 685 Diabetes Mellitus). Ces pathologies génétiques monogéniques sont le résultat de mutations 686 affectant une dizaine d'exons d'HK4. Le glucose ne pouvant alors être utilisé correctement 687 par les cellules affectées, ces mutations sont responsables d'hyperglycémie plus ou moins 688 sévère. Les mutations MODY-2 induisant une hyperglycémie souvent modérée ne sont 689 généralement pas traitées. En cas d'hyperglycémie trop sévère, les traitements sont basés sur 690 ceux du diabète de type 1 et 2 à savoir une hygiène de vie stricte ainsi qu'une 691 insulinothérapie.

Les mutations de type PNDM d'HK4 sont beaucoup plus impactantes puisqu'elles sont associées à un retard de croissance *in-utero* et apparaissent dès la naissance. Elles se traduisent par une intolérance majeure au glucose. Un traitement à l'insuline est nécessaire à vie (Froguel et al., 1992; Galan et al., 2006; Njolstad et al., 2003; Sagen et al., 2006; Vionnet et al., 1992).

697 A l'inverse, d'autres mutations entrainent une sur-activation de l'enzyme induisant 698 ainsi des hypoglycémies. Elles sont moins fréquentes que les pathologies avec perte de 699 fonction, et elles sont, la plupart du temps, induites par des substitutions au niveau de site 700 distant du site de fixation du glucose. C'est notamment le cas de la PHHI (Severe Persistent 701 Hyperinsulinemic Hypoglycemia) qui chez les patients, se traduit par une activation et 702 stabilisation d'HK4 et s'accompagne d'une sécrétion très importante d'insuline. Les formes 703 les plus sévères de la maladie apparaissent au cours des six premiers mois de la vie et peuvent 704 conduire au décès (Cuesta-Munoz et al., 2004).

D'autres mutations ont été également identifiées notamment des mutants avec une instabilité de l'enzyme HK4 (conduisant à une hyperglycémie) ou encore une perte d'interaction avec GKRP (conduisant à une hypoglycémie).

708

709 Matschinsky a créé un modèle mathématique à partir des propriétés cinétiques des 710 variants d'HK4 permettant de prédire le taux de glucose nécessaire à l'induction de sécrétion 711 d'insuline, le GSIR (Glucose-Stimulated Insulin Response) (Davis et al., 1999). Ce modèle 712 prévoit que la sécrétion d'insuline est induite dés que le taux de phosphorylation du glucose 713 par HK4 atteint les 25% de la concentration en glucose. Ce taux est normalement atteint 714 lorsque la concentration en glucose est de 5mM dans l'organisme. L'existence d'une mutation 715 modifiant l'activité d'HK4 perturbe le niveau de glucose nécessaire à la sécrétion d'insuline. 716 Ainsi, les patients porteurs d'une mutation de type MODY ont donc besoin d'une 717 concentration sanguine en glucose supérieure pour permettre la sécrétion d'une même 718 quantité d'insuline (chez les patients le modèle prévoit que la valeur GSIR soit à 7mM ce qui 719 est en accord avec les observations cliniques chez les patients (entre 6,8 et 7,3mM de glucose 720 sont nécessaires pour permettre une activation de sécrétion d'insuline induite avec 721 normalement 5mM de glucose). A l'inverse, les patients ayant une mutation avec gain de 722 fonction comme les PHHI, la valeur du GSIR diminue vers un taux plus faible compris entre 723 1,4 et 3,1mM.

Afin de traiter le diabète de type 2 des activateurs d'HK4 (GKA, *GlucoKinase activators*) ont été activement développés. Ces activateurs en se fixant au niveau d'un site de

726 fixation distinct de celui du glucose et du régulateur d'HK4, GKRP, permettent de maintenir 727 l'enzyme dans une conformation fermée et active, d'augmenter la vitesse de catalyse 728 enzymatique et promeuvent ainsi l'accumulation de glucose-6-phosphate, de glycogène et 729 fructose-1-phosphate notamment. L'accumulation de fructose-1-phosphate permet aux GKA 730 de réguler indirectement l'association entre HK4 et GKRP. Cependant malgré d'importants 731 espoirs fondés sur le développement de telles molécules (RO-28-1675, LY2608204, 732 GKA50...) pour le traitement du diabète de type 2 (Bonadonna et al., 2010; Brocklehurst et 733 al., 2004; Grimsby et al., 2003; Johnson et al., 2007; Matschinsky, 2009), ces composés se 734 sont révélé dangereux. L'activation d'HK4 ainsi provoquée entrainaient des hypoglycémies 735 chez les animaux traités. Ils sont aujourd'hui abandonnés dans un but thérapeutique 736 (Meininger et al., 2011).

737

8) Les autres fonctions de l'HK

738

739 Outre son rôle d'enzyme catalytique du métabolisme cellulaire, les HKs peuvent avoir
740 d'autres fonctions au sein des cellules.

741 Les HKs peuvent être notamment impliquées dans l'immunité innée cellulaire. L'induction de 742 l'expression d'HK a été montrée comme participant à l'activation de la différenciation et de la 743 maturation des cellules immunitaires notamment de cellules dendritiques dérivant de 744 monocytes. L'activation de TLR4 par stimulation au LPS induit une surexpression d'HK2 par 745 accumulation d'HIF1a dépendante de la voie P38-MAPK (Perrin-Cocon et al., 2018). Ce 746 mécanisme est également retrouvé pour les cellules responsables de l'immunité adaptative 747 lors, notamment, des reprogrammations métaboliques accompagnant l'activation des 748 lymphocytes T helper (LT CD4+). La stimulation des LT CD4+ induit une augmentation du 749 niveau d'expression des HKs nécessaire à l'augmentation de la glycolyse. Cette augmentation 750 d'expression est indépendante de l'isoenzyme d'HK, le lymphocyte pouvant compenser 751 l'invalidation d'un des gènes d'HK par l'induction de l'expression d'un autre. Il semblerait 752 exister des phénomènes de compensation permettant ainsi d'augmenter la glycolyse pour 753 subvenir à la demande d'énergie nécessaire à l'activation cellulaire (Varanasi et al., 2018).

Outre le rôle d'activateur métabolique des effecteurs de l'immunité, les HKs peuvent également jouer le rôle de senseur de pathogène. L'HK2 a notamment été montrée pour jouer le rôle de récepteur d'un PAMP bactérien issu de la dégradation lysosomale du peptidoglycanne de la paroi des bactéries gram positives : le N-acétylglucosamine (NAG) (Wolf et al., 2016). La fixation du NAG sur l'HK2, par compétition avec le glucose pour sa fixation sur le site actif de l'enzyme, inhibe son activité en la dissociant de la membrane externe mitochondriale. Cette dissociation active alors la cascade de l'inflammasome NLRP3 régulant la sécrétion de l'IL-1 β et IL-18, interleukines potentialisant la réponse immunitaire innée et participant à la mise en place de la réponse adaptative. Le mécanisme précis responsable de l'activation de l'inflammasome par l'HK est encore à ce jour inconnu.

764

Les HKs inhibent également l'apoptose cellulaire. HK1 et HK2 notamment interagissent avec le canal VDAC de la membrane externe mitochondriale grâce à l'enchaînement de 21 AA aminés hydrophobes de l'extrémité N-terminale de leur séquence protéique. Cette interaction empêche l'ouverture du canal et ainsi le relargage du cytochome c dans le cytoplasme de la cellule à l'origine de la cascade d'activation des caspases (*Cystein Aspartic Acid-Specific Protease*) (Azoulay-Zohar et al., 2004; Majewski et al., 2004; Pastorino et al., 2002; Roberts and Miyamoto, 2015; Roberts et al., 2014).

772 Cette particularité de cette isoenzyme HK2 est impliquée dans beaucoup des mécanismes
773 moléculaires décrits dans de nombreuses transformations cellulaires qui s'accompagnent d'un
774 changement d'expression d'isoenzyme d'HK.

775 De façon intéressante, les virus utilisent cette capacité des HKs à contrôler l'apoptose 776 pour leur avantage. Des travaux sur le virus de l'immunodéficience humaine ont montré que 777 l'infection et plus précisément la protéine virale régulatrice Vpr conduit à une surexpression 778 spécifique de l'isoforme 1 d'HK. De façon surprenante, cette surexpression n'est cependant, 779 pas associée à une augmentation de l'activité enzymatique. En revanche, l'infection induit en 780 plus de la surexpression, la relocalisation de l'HK au niveau de la membrane externe 781 mitochondriale inhibant ainsi le relargage cytoplasmique de molécules mitochondriales 782 responsables de l'activation de la cascade de caspase (3 et 7 notamment) à l'origine de 783 l'apoptose (Sen et al., 2015).

- 784 II. Virus et énergie de réplication
- 785

Il y a plus de cinquante ans, une série d'études scientifiques a permis de relier le détournement des voies du métabolisme cellulaire par les virus pour leur réplication (Fernandez-Garcia et al., 2009). La plupart de ces études portaient sur la glycolyse. Plus récemment, grâce à l'avènement de nouvelles technologies de métabolomique, telles que la résonnance magnétique nucléaire, l'étude des perturbations du métabolisme par l'infection virale connaît un regain d'intérêt. Les différents travaux ont démontré une plus large modification des voies du métabolisme cellulaire par les virus comme la voie de biogenèse et dégradation des lipides, des voies de l'autophagie ou mitochondriales et ce de façon différente suivant les types de virus y compris pour ceux appartenant à une même famille virale (Sanchez and Lagunoff, 2015).

796

1) Virus et glycolyse

797

798 Comme précédemment expliqué, la glycolyse en tant que voie d'entrée du glucose est 799 une voie métabolique clé pour les cellules mais donc également pour la réplication des virus. 800 Il n'est donc pas surprenant que les virus aient sélectionné des mécanismes leur permettant de 801 détourner cette voie à leur avantage. Les premières observations de l'utilisation de glucose et 802 du détournement de la glycolyse ont été réalisées sur les poliovirus dans les années 50. A 803 cette époque, l'utilisation de différents milieux de culture sur des cellules HeLa infectées au 804 poliovirus montre que seuls le glucose et le fructose permettent une production efficace de 805 particules virales (Darnell and Eagle, 1958). D'autres études ont largement confirmé que 806 différents virus, de différentes familles virales augmentaient la glycolyse dans la cellule 807 infectée.

808 Le virus Influenza, responsable de la grippe, stimule la glycolyse aux stades précoces 809 de l'infection en augmentant la consommation de glucose et la sécrétion de lactate des 810 cellules en culture (Ritter et al., 2010). Il en est de même pour le virus de l'hépatite C (HCV) 811 et pour lequel il a été montré, au sein de l'équipe, qu'une infection est responsable d'une 812 augmentation de la glycolyse et de la sécrétion de lactate via une interaction de la protéine 813 non-structurale NS5A du virus et l'HK2 cellulaire. Plus précisément le domaine D2 de la 814 protéine virale interagit et se comporte comme un activateur enzymatique allostérique d'HK2 815 qui pourrait, du moins en partie, expliquer l'augmentation de la glycolyse observée suite à une 816 infection avec HCV (Ramiere et al., 2014). L'infection de LT CD4+ humains par HIV-1 817 augmente le niveau d'expression des transporteurs GLUT1, 3, 4 et 6 ainsi que l'expression 818 d'HK1 afin de répondre aux besoins énergétiques sollicités par la réplication du virus 819 (Kavanagh Williamson et al., 2018). L'infection par des papillomavirus humains (HPVs), en 820 particulier 16 et 18, peut conduire à des développements de cancers et induire des 821 changements métaboliques couramment rencontrés au cours de la transformation tumorale. 822 Parmi eux, la surexpression de l'HK2 a déjà été démontrée comme cause de l'augmentation 823 de la glycolyse observée. Des travaux ont permis de montrer que les protéines E6/E7 des 824 HPVs sont suffisantes à l'induction et le maintien de l'expression d'HK2 dans les cellules infectées. L'expression de ces deux protéines permet une stabilisation de l'oncogène Myc
responsable d'une activation transcriptionnelle d'HK2 ainsi que d'une diminution de la
sécrétion du microRNA miR-143-3p impliqué dans la dégradation des ARNm de l'HK. Ces
deux phénomènes couplés sont responsables d'une augmentation de l'expression d'HK2
pouvant expliquer l'augmentation de la glycolyse observée dans ces cellules (Hoppe-Seyler et
al., 2017).

831 La famille des Herpesviridae (HHVs) utilise également la glycolyse comme source 832 d'énergie et de survie dans les cellules infectées. Le KSHV (pour Kaposi's sarcoma-833 associated herpesvirus) appartenant à cette famille, est un autre virus oncogénique. Lors du 834 développement du sarcome de Kaposi, suite à l'infection au KSHV, il a été montré que le 835 maintien du virus dans les cellules infectées en phase latente était possible par augmentation 836 de la consommation de glucose et de la sécrétion de lactate malgré la présence d'oxygène. Cet 837 effet, semblable à l'effet Warburg observé dans les cellules cancéreuses, participerait à 838 l'établissement d'un microenvironnement favorable au développement tumoral (Delgado et 839 al., 2010). Une autre conséquence de l'infection par le KSHV est le développement d'un 840 lymphome de cellules B non-Hodgkinien. Les cellules infectées et avant développé ce type de 841 lymphome ont une glycolyse et une synthèse d'acides gras (AGs) augmentées. Ces augmentations sont connectées : d'abord, comme nous le verrons ci-dessous, la glycolyse 842 843 peut être nécessaire à l'anaplérose pour d'autres voies métaboliques comme la synthèse 844 d'AGs. Ensuite l'inhibition de l'activité de l'enzyme responsable de la synthèse d'AGs, la 845 FAS (pour fatty acid synthase) par traitement au C75, diminue de manière significative la 846 glycolyse de ces cellules. Enfin, ces deux voies métaboliques dépendent de l'activité PI3K-847 AKT (Bhatt et al., 2012). Un autre HHV, le cytomégalovirus humain (HCMV) augmente 848 également la consommation de glucose aux stades précoces de l'infection : lors de la fixation 849 et de l'entrée des particules virales dans les cellules cibles. Cette augmentation se fait par un 850 mécanisme dépendant de la kinase de calmoduline (CAMKK, Calmodulin-dependant Kinase 851 Kinase) (McArdle et al., 2011). Bien que ces virus appartiennent à la même famille, les 852 conséquences sur le métabolisme ne sont pas les mêmes : le HCMV augmente la glycolyse 853 afin de promouvoir le cycle de Krebs et aboutir à la biogenèse des lipides alors que l'HSV-1 854 (Herpes Simplex Virus-1) stimule la glycolyse afin d'accumuler de l'oxaloacétate nécessaire à 855 la biosynthèse des pyrimidines (Vastag et al., 2011). Ceci illustre parfaitement l'hétérogénéité 856 et la complexité du détournement du métabolisme cellulaire par les virus.

857 Cela montre également qu'outre la production d'énergie (comme nous l'avions déjà 858 sous entendu au paragraphe précédent, cette voie peut être utilisée comme une source

859 d'intermédiaires alimentant d'autres voies métaboliques comme la voie de lipogenèse de 860 novo. Ce phénomène est particulièrement présent dans les cellules hépatocytaires qui sont 861 capables de synthétiser des TGs à partir de la glycolyse. Ces TGs pouvant alors être 862 catabolisés en AGs et utilisés par β-oxydation. Ceci a été particulièrement décrit et étudié 863 dans le cas d'une infection DENV. Siguiera et al. ont pu montrer que dans une lignée de 864 cellules hépatiques, les HuH7, suite à une infection par le DENV, l'induction de glycolyse 865 n'est pas utilisée comme simple source énergétique, mais, favorise l'oxydation des AGs 866 devenant alors la source énergétique cellulaire majeure (Fernandes-Siqueira et al., 2018). Plus 867 précisément une autre étude montre que l'interaction de la protéine non-structurale 3 (NS3) 868 du DENV avec la GAPDH (glycéraldehyde- 3-phosphate deshydrogénase) serait en partie 869 responsable de ce phénomène. L'interaction directe entre la protéine NS3 entière mais aussi 870 de ses sous-domaines avec la GAPDH, protéine majoritairement cytoplasmique, est 871 responsable d'une relocalisation de la protéine au niveau du réticulum endoplasmique 872 rugueux (RER) probablement au niveau des poches de réplication. Elle inhibe ainsi son 873 activité et conduit à une accumulation d'intermédiaires qui seront utilisés comme substrats 874 d'autres voies métaboliques dont la lipogenèse (Silva et al., 2019). Nous reviendrons sur ce 875 point dans le paragraphe suivant. Les auteurs de l'article décrivent également d'autres 876 interactions de la protéine NS3 DENV avec de nombreuses enzymes du métabolisme 877 cellulaire dont les conséquences n'ont pas été étudiées. Parmi elles, on retrouve des 878 interactions avec des enzymes de la glycolyse comme l'aldolase, de la synthèse de purine 879 comme la 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide formyltransférase, du 880 métabolisme lipidique comme l'apolipoprotéine H ou encore des liens avec la 881 phosphorylation oxydative par interaction avec la cytochrome C oxydase.

882

2) Virus et métabolisme lipidique

883

Depuis une dizaine d'années, des travaux de recherche portent désormais sur le détournement des voies de biosynthèse, de dégradation et de signalisation des lipides par les virus. Les lipides jouent un rôle clé pour la réplication virale et les virus ont déployé de multiples stratégies pour les utiliser au cours de leur cycle réplicatif depuis l'étape d'infection de la cellule hôte jusqu'à la sécrétion de nouveaux virions. Les lipides ont en effet été montrés pour non seulement faciliter les processus de fusion et d'entrée des particules virales dans les cellules, mais également participer à l'établissement de structures de réplication virale (le 891 *« membranous web »* pour les *Flaviviridae*) et de genèse de particules virales infectieuses en
892 formant l'enveloppe du virion en maturation.

Ainsi, de multiples études sur divers virus ont déjà démontré l'importance des lipides dans la réplication virale : le HCMV provoque une augmentation d'expression des gènes et des métabolites impliqués dans la glycolyse, le cycle de l'acide citrique et de la voie de biosynthèse des pyrimidines (Munger et al., 2006; Sanchez and Dong, 2010), tout cela en partie pour permettre une augmentation majeure de biosynthèse des lipides et non pour alimenter la voie de phosphorylation oxydative (Munger et al., 2008; Yu et al., 2011a).

Dans la cellule, les lipides peuvent provenir de deux sources différentes : depuis la
circulation sous forme de lipoprotéines, produits des lipides exogènes de l'alimentation ou
source interne à la cellule par utilisation de stocks lipidiques contenus sous forme de
gouttelettes de TGs présentes de façon abondante dans les tissus hépatiques et adipeux.
L'utilisation des stocks de lipides par les virus a deux objectifs : produire de l'énergie
nécessaire à la réplication par dégradation (β oxydation) des AGs, et synthétiser les lipides
nécessaires pour l'assemblage et la génération de nouveaux virions.

906

A- L'entrée des virus dans la cellule

907

Les membranes plasmiques des cellules, organisées en bicouches lipidiques constituent la première barrière à laquelle les virus sont confrontés et qu'ils doivent franchir pour pouvoir infecter une cellule. Aussi, les virus ont mis au point différentes stratégies leur permettant non seulement de s'affranchir de la barrière protectrice constituée des lipides membranaires mais de les utiliser comme des récepteurs directs ou indirects ou bien, d'en faire des cofacteurs indispensables à l'acquisition de leur pouvoir infectieux dans les cellules.

Les protéines de la capside de virus non-enveloppés, comme des *Polyomavirus*, interagissant
avec les glycosphingolipides membranaires, permettent au virion d'être directement
internalisé et ainsi d'infecter la cellule cible (figure 11.A) (Taube et al., 2010; Tsai et al.,
2003).

HCV, membre de la famille des *Flaviviridae*, détourne, au niveau des cellules hépatiques, des processus physiologiques de reconnaissance de lipoprotéines par leur récepteur cellulaire permettant leur attachement amorçant leur internalisation. En s'associant aux lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein*, LDL), HCV génère des particules hybrides entre des composés viraux et des lipoprotéines qui prennent alors le nom de lipo-viro-particules (LVPs). Les LVPs comportent à leur surface des apolipoprotéines 924 (Apo) notamment l'ApoB et l'ApoE qui assurent l'attachement au LDL-R. L'attachement des
925 LVPs est également possible grâce aux glycoaminoglycanes (GAGs). Les LDL sont
926 internalisés par endocytose médiée par la clathrine et les LVPs profitent donc de cette
927 reconnaissance pour pouvoir infecter spécifiquement les cellules hépatiques (figure 11.B)
928 (Agnello et al., 1999; Douam et al., 2015; Molina et al., 2007).

Par ailleurs, les zones enrichies en cholestérol permettent une concentration en récepteurs aux
virus, favorisant ainsi l'incorporation du virus dans la cellule. Des travaux portant sur le virus
de l'immunodéficience humaine (HIV) prouvent que la glycoprotéine GP120 de surface du
HIV nécessite la présence de plateformes enrichies en cholestérol sur la membrane plasmique
de la cible pour pouvoir interagir efficacement avec son récepteur CD4 et son corécepteur
d'entrée CCR5 (figure 11.C) (Yi et al., 2006).



935 <u>Figure 11:</u> Illustrations de l'utilisation des lipides comme cofacteurs d'entrée des 936 particules virales pour le polyomavirus (A), HCV (B) et HIV (C).

937

938 Dans le cas du DENV, les lipides jouent un rôle dans l'entrée en particulier lors de 939 l'étape de libération du virus dans le cytoplasme cellulaire après fusion de l'enveloppe virale 940 avec la membrane de l'endosome tardif. En effet, une étude a montré qu'en plus de 941 l'acidification du contenu endosomal, la présence de bismonoacylglycerophosphate (BMP), 942 spécifique aux membranes de l'endosome tardif, était nécessaire et indispensable à la 943 libération du génome viral. Cela permet au DENV d'éviter une fusion prématurée des virions 944 avec des endosomes précoces qui serait à l'origine de leur inactivation (Zaitseva et al., 2010). 945 Les mécanismes moléculaires d'entrée du DENV seront détaillés plus précisément au 946 troisième chapitre de cette introduction.

947 Enfin, l'interaction de récepteurs spécifiques de certains lipides avec les virions peut 948 également conditionner leur pouvoir infectieux comme cela a pu être mis en évidence dans le 949 cas d'HCV pour l'interaction du virus et du récepteur cellulaire des HDL : SR-BI (Scavenger 950 receptor class B type I). SR-BI qui est responssable de l'influx de cholesterol dans 951 l'hépatocyte, permettrait l'attachement et conditionnerait la capacité à interagir avec le 952 récepteur CD81 lui-même responsable du recrutement de la protéine Claudine-1 constituant 953 des jonctions serrées. De cette manière SR-BI amorcerait l'intégration des LVPs dans les 954 hépatocytes. Il semblerait toutefois, que l'activité de SR-BI et LDLr soit redondante et qu'ils 955 favoriseraient tous deux l'amorçage de l'internalisation (Dreux et al., 2009; Yamamoto et al., 2016). De plus, la composition en lipides contenue dans la LVP conditionne sa fixation sur la 956 957 cellule cible : la déplétion en cholestérol esters, en TGs et en Apo (en particulier la E) des 958 LVPs réduit considérablement leurs capacités infectieuses (Lavie and Dubuisson, 2017; 959 Shimizu et al., 2010; Yamamoto et al., 2011).

960 961

B- La réplication virale

962 Une fois entrés et libérés dans la cellule, les virus vont se répliquer et former de 963 nouveaux virions. Pour permettre une réplication efficace, les virus dont le cycle réplicatif est 964 cytosolique, comme les *Flaviviridae*, vont pousser les membranes d'organelles cellulaires à se 965 réorganiser (membrane du réticulum endoplasmique (RE), du Golgi, des endosomes, des 966 lysosomes et des mitochondries) afin de former des sites de réplication. Les modifications ne 967 sont pas seulement des réorganisations des membranes mais bien une induction de synthèse 968 de lipides, constituants clés des membranes de ces organelles. Au-delà de former un 969 microenvironnement privilégié et protégé des attaques du système immunitaire pour le virus, 970 ces poches assurent une concentration en facteurs viraux et cellulaires nécessaires à la 971 réplication dont l'organisation en fait de véritables usines de genèse de nouveaux virions (den 972 Boon and Ahlquist, 2010; Miller and Krijnse-Locker, 2008). Macroscopiquement, elles se 973 présentent sous la forme de poches attenantes à la membrane d'une organelle dans lesquelles 974 le virus se réplique et très souvent, elles sont associées à un sous-compartiment spécifique de 975 l'assemblage du virion. Afin de modéliser la création de ces poches, même si les mécanismes 976 exacts sont encore parfois mal définis, les recherches ont montré que ce sont souvent les 977 protéines NS du virus comme la protéine NS4A des *flavivirus* qui sont impliquées dans ce 978 processus (Miller et al., 2007; Roosendaal et al., 2006). Des protéines de l'hôte cellulaire, 979 sous l'influence de protéines virales, participent également à cette organisation en favorisant

63

980 non seulement la courbure des membranes des organelles mais aussi en générant des 981 constituants des complexes réplicatifs. Par exemple, il a été montré dans le cas des flavivirus, 982 qu'une infection au virus West Nile (WNV) induisait une redistribution du cholestérol 983 cellulaire accumulé dans les radeaux lipidiques membranaires ainsi que de l'enzyme 3-984 hydroxymethylglutaryl-CoA réductase, impliquée dans la synthèse de cholestérol elle-même, 985 au niveau des complexes de réplication formés au RE. Cela permet d'augmenter la surface de 986 ces membranes permettant aux virions une meilleure réplication. Par ailleurs, le cholestérol 987 membranaire, concentré notamment dans les radeaux lipidiques, joue un rôle dans la 988 transduction du signal de l'interféron (IFN) par la voie Jak/Stat afin de lutter efficacement 989 contre l'infection virale. Sa diminution en surface cellulaire, perturbe ainsi l'organisation des 990 radeaux lipidiques empêchant ainsi la mise en place d'une réponse immunitaire innée efficace 991 permettant de limiter la propagation virale (Mackenzie et al., 2007).

992

993 L'importance du cholestérol a également été montrée dans l'infection par le DENV. 994 En effet, l'inhibition de l'expression des enzymes impliquées dans la biogenèse du cholestérol 995 par siRNA ou l'utilisation de molécules inhibitrices comme les statines inhibent la réplication 996 du DENV (Rothwell et al., 2009). De même, la protéine NS3 du DENV relocalise et stimule 997 la FAS, au niveau des complexes de réplication du virus (Heaton et al., 2010). Les protéines 998 virales et cellulaires n'agissent donc probablement pas de façon indépendante mais en 999 synergie afin de modéliser au mieux les complexes et l'activité de réplication. Une bonne 1000 illustration de ce phénomène est observée avec un autre Flaviviridae, HCV, pour lequel 1001 NS4B orchestre le réarrangement membranaire en stimulant la biosynthèse de stérol pendant 1002 que NS5A, lui, stimule l'activité de l'enzyme cellulaire phosphatidylinositol-4 kinase III 1003 alpha à l'origine de la synthèse de phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) crucial pour 1004 l'intégrité du « membranous web » induit par le virus (Reiss et al., 2011).

1005

Une autre illustration avec le DENV qui stimule l'autophagie spécifiquement au
niveau de ces formes de stockages lipidiques. Cela permet la libération des TGs sous forme
d'AGs libres utilisés alors comme source alimentant la voie de la β-oxydation pour produire
de l'énergie (Heaton and Randall, 2010).

1010 Le DENV lui, va, en fait, jouer sur ces deux possibilités : la stimulation et la dégradation des 1011 AGs. Il va augmenter la dégradation des AGs déjà existant par β -oxydation mais va 1012 également stimuler leur synthèse en absorbant les LDs au niveau des sites de réplication et 1013 relocaliser la FAS au niveau de ces sites de réplication, au niveau du RE. En 2017, Jordan et 1014 Randall ont analysé l'implication de l'autophagie en utilisant un modèle de réplicon 1015 subgénomique (rSg) ne comportant que les protéines non structurales (NS) du virus (Jordan 1016 and Randall, 2017). Même s'ils ne montrent aucun résultat d'expérience, ils évoquent une 1017 réplication de ce réplicon dépendante et induisant la lipophagie mais que ce phénomène ne 1018 peut être induit par les protéines NS prises seules à seules. Cela montre que l'association des 1019 protéines NS du virus est capable d'induire l'autophagie des lipides et/ou que la lipophagie 1020 est dépendante de l'activité cellulaire suite à la réplication du DENV.

1021 Cette observation témoigne d'une relation étroite entre le métabolisme des lipides et le DENV
1022 et pourrait expliquer une partie de nos observations que nous développerons à l'occasion de la
1023 présentation des résultats en particulier concernant l'effet de NS3 sur la quantité de lipides
1024 neutres intracellulaires.

1025

1026 Comme déjà évoqué, il a été montré pour plusieurs virus, que le détournement du 1027 métabolisme lipidique participe à la formation de poches de réplication (*vesicles packets*) afin 1028 de concentrer la biogenèse virale. Ces poches constituent également un microenvironnement 1029 permettant aux structures virales en cours de synthèse une exclusion des facteurs de 1030 l'immunité innée ainsi que des attaques potentielles des nucléases cellulaires (Chatel-Chaix 1031 and Bartenschlager, 2014; Hoenen et al., 2007; Ma and Suthar, 2015; Romero-Brey and 1032 Bartenschlager, 2016).

1033

C- Importance des gouttelettes lipidiques

- 1034
- 1035 Les gouttelettes lipidiques (LDs, *Lipid droplets*), sont présentes dans le cytoplasme
 1036 des cellules et participent à l'assemblage des virions.

1037 Les LDs aussi appelées adiposomes, corps lipidiques ou corps huileux sont des organelles 1038 intracellulaires retrouvés dans la plupart des cellules. Elles sont synthétisées au départ à partir 1039 du RE où a lieu la lipogenèse. Comme leur nom l'indique, elles se présentent sous forme de 1040 gouttelettes de gras insolubles dans l'eau et dispersées dans le cytoplasme cellulaire aqueux. 1041 Leur rôle consiste à stocker les lipides en excès afin de former des réserves énergétiques ainsi 1042 que des composants des membranes lipidiques. Ces LDs sont de taille plus ou moins grande 1043 suivant la quantité d'AGs libres disponibles et peuvent former une population uniforme ou au 1044 contraire disparate. Elles peuvent être dispersées ou condensées dans le cytoplasme des 1045 cellules. Ces LDs pourront soit disparaître soit fusionner avec des LDs de plus grosse taille. 1046 Elles se maintiennent dans les cellules plus ou moins longtemps suivant le type cellulaire et 1047 l'état physiologique de la cellule. Elles peuvent ensuite être dégradées en AGs qui pourront 1048 être de nouveau estérifiés dans des lipides membranaires ou pour permettre la production 1049 d'énergie par β oxydation ou encore être expulsés de la cellule (Thiam and Beller, 2017).

1050 D'un point de vue moléculaire, ces LDs permettent ainsi une séparation entre le domaine 1051 aqueux du cytoplasme cellulaire et les lipides hydrophobes. Elles s'organisent globalement en 1052 une sphère monocouche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées différentes protéines 1053 dont des protéines structurales (comme des périlipines), des enzymes impliquées dans le 1054 métabolisme lipidique (synthases comme acylcoA synthetase ou lipases comme l'adipose 1055 tisssues TGs lipase) et des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire (comme Rab5), 1056 enfermant un cœur de lipides neutres (principalement composé de TGs et d'esters de stérol) 1057 (figure 12).



1058 <u>Figure 12</u>: Composition d'une gouttelette lipidique (D'après Lipid Droplets at a glance, 1059 (Guo et al., 2009)).

1060 Les LDs se présentent sous forme de micelle limitée par une simple couche de phospholipides dans

1061 laquelle sont enchâssées ou attachées à la surface, des protéines de périlipines et des molécules de

1062 stérol. Ces LDs renferment des TGs et des esters de stérol. Leur taille peut varier de 20nm à 100μm.

1063

Les variations des types et des taux des différents TGs qu'ils contiennent ainsi que les différents types de protéines enchâssées dans leur manteau constituent différentes classes de LDs que peuvent contenir les cellules. Cette composition varie d'un type cellulaire à l'autre et suite à des modifications de l'état physiologique des cellules.

Longtemps assimilées à des entités inertes, leurs rôles et implications en physiologie pour
limiter une accumulation d'AGs délétère pour l'organisme mais aussi dans le développement
de pathologies métaboliques comme l'arthériosclérose ou l'obésité en ont fait un objet
d'étude aujourd'hui de premier ordre (Onal et al., 2017).

1072 Les protéines associées aux LDs (PAT) sont un ensemble de protéines présentant des séquences homologues et des domaines communs. Parmi ces protéines, on retrouve la 1073 1074 perilipine 1, la périlipine 2 aussi appelée adipophiline et la périlipine 3 ou TIP47. Le pattern et 1075 le niveau d'expression de ces différentes protéines sont corrélés dans l'hépatocyte à l'état 1076 physiopathologique de la cellule : l'adipophiline est augmentée en cas de stéatose, comme la 1077 périlipine et TIP47. La périlipine a d'ailleurs été montrée pour être un facteur de diagnostic de 1078 la stéatose. En s'accumulant au niveau des grosses LDs qui seront plus difficile à mobiliser, 1079 sa détection est positivement corrélée à la stéatose pouvant évoluer vers une stéatohépatite 1080 non-alcoolique (NASH), une cirrhose du foie puis un hépatocarcinome (Straub et al., 2010; 1081 Straub et al., 2008).

1082

1083 La synthèse des TGs du cœur des LDs se fait lorsque de nouveaux AGs libres rentrent 1084 dans les cellules par diffusion facilitée par la translocase. Il y a alors un processus de 1085 biogenèse de novo de TGs par association d'un AG avec un groupement CoA générant un 1086 acyl-gras puis de formation de diacylglycérols (DAG) au niveau du RE. Ces DAG seront 1087 alors soit convertis par les acyltransferases acyl-CoA en TGs ou bien entreront dans la voie de 1088 biogenèse des phospholipides. Pour ce qui est des stérols, leur genèse est un peu différente : 1089 ils peuvent être soit récupérés par les cellules par endocytose ou dégradation des lipoprotéines 1090 dans les lysosomes soit générés par la cellule elle-même. Seuls les excès de stérols seront 1091 transformés, dans le RE, en ester de stérols par conjugaison avec un acyl-CoA grâce aux 1092 sterol-O-acyltransferases (Guo et al., 2009).

1093

1094 La libération des lipides neutres dans les LDs a été modélisée de trois façons

- une première, canonique, selon laquelle les LDs sont formées par bourgeonnement du
 feuillet cytoplasmique de la membrane du RE et appelée le modèle de
 bourgeonnement du RE (figure 13.A)
- une seconde modélisation supposant une accumulation des lipides neutres entre les feuillets interne et externe de la membrane du RE. Au lieu d'un processus de bourgeonnement, une excision des feuillets de la membrane est induite emportant avec elle les lipides qu'elle contient. Cette méthode est appelée le modèle de bicelles (figure 13.B) (Ploegh, 2007).
- enfin, une façon propre aux cellules capables de produire des lipoprotéines comme les
 hépatocytes ou les entérocytes selon laquelle de petites vésicules par bourgeonnement
 de la membrane du RE restent rattachées à cette dernière et servent de plateforme de

1106génération des LDs. Les lipides neutres sont alors ajoutés à la vésicule1107bimembranaires et s'accumulent dans l'espace inter-membranaire écrasant la1108membrane interne. C'est le modèle vésiculaire (figure 13.C) (Walther and Farese,11092009).



1110 Figure 13 : Les modèles de genèse des LDs (Traduit (Guo et al., 2009)).

- 1111 La biogenèse des LDs n'a pas encore été totalement comprise. Trois modèles possibles de
- 1112 formation sont proposés : un modèle de bourgeonnement à partir de la membrane externe du
- 1113 *RE (A), un modèle de bicelles (B) et u modèle de bourgeonnement vésiculaires (C).*
- 1114 ESLN : Enzyme synthétisant les lipides neutres, RE : réticulum endoplasmique
- 1115

1116 Dans les cellules productrices de lipoprotéines tels que les entérocytes ou les 1117 hépatocytes, les lipides neutres peuvent également être adressés dans la lumière du RE afin de 1118 les associer à l'apolipoprotéine B pour générer des chylomicrons (cellules intestinales) ou des 1119 lipoparticules (cellules de foie) qui seront ensuite sécrétées (Fujimoto et al., 2008).

1120 Ces LDs peuvent elles-mêmes être utilisées par les virus comme des plateformes 1121 d'assemblage des virus. Les *Flaviviridae*, comme HCV et DENV ont été montrés pour être 1122 particulièrement aptes à se servir de ces LDs comme organelle d'assemblage. Les travaux de 1123 Bartenschlager ont ainsi montré que le néo-brin d'ARN d'HCV synthétisé était transporté aux LDs par les protéines NS, NS3 et NS5A, afin d'y être incorporé dans la capside virale via les
protéines NS2 et p7 (Bartenschlager et al., 2011). De plus, la protéine core d'HCV stimule
probablement via l'enzyme diglycéride acyltransférase (DGAT-1) la production des LDs à
proximité du RE (Herker et al., 2010).

1128 Le DENV, lui, utilise la surface des LDs comme présentoir des protéines constitutives de la capside permettant une optimisation de l'étape d'encapsidation lors de la formation des nouvelles particules infectieuses (Samsa et al., 2009). Les AA hydrophobes de lysine localisés au niveau du centre de la séquence de l'hélice $\alpha 2$ de la protéine de capside en position 50 ou 54 sont nécessaires à l'incorporation de protéine de capside dans les LDs.

1133

D- Sécrétion virale

1134

1135 Enfin, les lipides jouent un rôle clé pour la formation des particules virales de virus 1136 bourgeonnant à partir de la membrane plasmique des cellules. Par exemple, pour HIV, d'un 1137 côté les radeaux lipidiques, assurent son bourgeonnement à partir de la membrane et d'un 1138 autre, la voie de signalisation lipidique et plus précisément la protéine GAG, protéine 1139 structurale majeure du virus, recrute et concentre le $PI(4,5)P_2$ membranaire au niveau 1140 nanoplateforme d'assemblage pour permettre une encapsidation efficace (Favard et al., 1141 2019).

1142 Pour les Flaviviridae, virus bourgeonnant à partir de la membrane du RE, ces lipides jouent également un rôle dans la sécrétion des nouvelles particules virales ainsi que dans 1143 1144 l'acquisition de leur pouvoir infectieux. Le modèle le mieux compris et caractérisé est celui 1145 d'HCV. En effet, même si ce virus génère des virions de différente densité, il se sert de la 1146 voie de sécrétion des lipoprotéines de très faible densité ou VLDL (Very Low Density 1147 Lipoproteins) pour pouvoir former (en utilisant notamment les Apo B et E, constituant ces 1148 VLDL comme constituants des particules virales) des particules virales de faible densité dans 1149 la circulation (Andre et al., 2002; Nielsen et al., 2006).

1150

3) Induction de la lipogénèse dans l'hépatocyte

1151

Le foie est un organe capable de stocker les excès de glucose sous forme de glycogène mais en cas d'excès de glucose, notamment lors d'une alimentation riche en carbohydrates, une partie du glucose absorbé est utilisée comme source de carbone pour la synthèse des lipides. Lorsque ces quantités sont trop importantes, les lipides s'accumulent sous forme de TGs dans les LDs. 1157 Ce n'est pas le glucose lui même mais l'obtention du xylulose-5-phosphate à partir du 1158 glucose-6-phosphate par la voie des pentoses phosphate qui est responsable de l'activation de 1159 synthèse des AGs. En effet, le xylulose-5-phosphate active la phosphatase sérine/thréonine 1160 PPA2. Cette protéine déphosphoryle à son tour le facteur de transcription chREBP 1161 (carbohydrate-responsive element binding protein) au niveau de la sérine en position 196 1162 localisée près de la séquence d'adressage nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal) ainsi 1163 qu'au niveau du résidu thréonine 666 du site hélice-boucle-hélice (bHLH). La première déphosphorylation a lieu au niveau cytoplasmique et est responsable de la translocation 1164 1165 nucléaire de ce facteur chREBP au noyau où il subira la seconde déphosphorylation pour y 1166 exercer son rôle de facteur de transcription (figure 14).



1167 <u>Figure 14 :</u> Structure de la protéine chREBP (Kabashima et al., 2003).

1168

1169 Ce facteur est activateur des gènes codant entre autre des enzymes lipogéniques 1170 comme l'acétyl-CoA carboxylase et la FAS.

1171 Son activité est corrélée à celle de la PFK, phospho-transférase, qui assure en parallèle de la

biosynthèse des TGs, le maintien de pool de fructose-1,6-biphosphate permettant de produire

1173 des molécules d'acétyl-CoA via le cycle de Krebs, précurseurs de base des AGs (figure 15).



1174 <u>Figure 15 :</u> Voie des pentoses phosphates et synthèse d'AGs (D'après (Kabashima et al.,
1175 2003) et (Dentin et al., 2006)).

1176 La voie des pentoses phosphates permet la synthèse de TGs par FAS à partir d'acétyl-CoA dérivant du
1177 citrate généré par le cycle de Krebs. L'activation de la FAS est régulée par l'activité du facteur de
1178 transcription ChREBP.

1179

À l'inverse les AGs alimentaires polyinsaturés, comme l'acide linoléique, eicosapentanoïque ou docosahexaenoïque par exemple, assurent une inhibition de l'expression du facteur chREBP mais également de la translocation nucléaire du chREBP restant. Ceci l'empêche ainsi de jouer son rôle de facteur de transcription activateur des gènes de la lipogenèse (comme FAS) et de la glycolyse (comme HK) (Dentin et al., 2006).
1185 **Chapitre 2 : Les virus et les réactions immunitaires**

1186 L'immunité innée permet le contrôle de la propagation du pathogène aux stades 1187 précoces d'une infection qu'elle soit d'origine bactérienne, virale, parasitaire ou liée à un 1188 développement tumoral. Dans le contexte de l'infection virale, l'un des premiers éléments 1189 responsables de la mise en place de cette immunité est l'interféron (IFN).

1190 Cette cytokine va limiter l'infection en activant l'expression de gènes qui limiteront la capacité des cellules infectées à répliquer le virus. Des cellules du système immunitaire inné 1191 1192 comme les cellules natural killer (NK) et les macrophages pourront également être activées 1193 par cette cytokine et participer à la destruction des cellules infectées. L'IFN peut être produit 1194 par la cellule infectée suite à l'activation de récepteurs spécifiques de structures virales Mais 1195 d'autres cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques (DCs) ou les monocytes 1196 sont capables de produire des quantités importantes d'IFN. Il existe différents types d'IFN que l'on peut classer en trois catégories, les IFN type I, II et III, selon les cellules productrices 1197 1198 ainsi que leur fonctions biologiques. Les types I et III sont produits par des cellules infectées 1199 et sont impliqués dans des processus anti-viraux alors que l'IFN de type II est produit par des 1200 lymphocytes et est utile pour la communication entre les différentes cellules immunitaires. 1201 Ces différents types d'IFN regroupent eux-mêmes différents sous types (tableau 4).

Type d'IFN	Sous-types	Cellules productrices	Conditions de production
Ι	IFN α/β : principaux IFN ω/κ/ε : secondaires	Cellules infectées (virus en particulier)	Immunité innée anti-virale
II	IFN γ	Lymphocytes	Communication entre cellules immunitaires
III	IFN λ	Cellules infectées	Immunité innée anti-virale

1202 <u>Tableau 4 :</u> Les différents types d'IFN (D'après (Lazear et al., 2019; Lee and Ashkar, 1203 2018)).

1204

1205Chez l'homme, ces IFN sont codées par 21 gènes : 13 gènes pour l'IFN α, 3 pour1206l'IFN λ et un seul gène pour les IFNs β , $\omega/\kappa/\epsilon$ et γ .

Parmi ces différentes formes d'IFN, l'IFN de type I est le système antiviral le plus impliqué
suite à une infection virale.

1209

I. Les mécanismes de contrôle des pathogènes

1210

1211 Lorsqu'une cellule est infectée par un virus, cette dernière reconnait des motifs 1212 moléculaires du pathogène appelés des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) 1213 grâce à des récepteurs cellulaires ou PRRs (Pattern recognition Receptors) qui vont ensuite 1214 permettre l'activation des voies de défenses cellulaires. Les PAMPs correspondent à un grand 1215 nombre de molécules de nature (protéines, oses, acides nuclétiques etc) et d'origine (parasite, 1216 virus, bactéries etc) diverses. Dans le cas des infections virales ce sont souvent la présence 1217 cytosolique d'ARNs double-brin ou d'ADNs qui sont des inducteurs de réponses 1218 immunitaires. Pour le DENV, ce sont les intermédiaires de réplications sous forme d'ARNs 1219 simple et double brin qui représentent les meilleurs PAMPs produits par les cellules infectées 1220 car ils sont produits précocement et sont facilement reconnaissables par les PRRs cellulaires.

1221

1) Les PRRs, des récepteurs de l'immunité innée

Les PRRs se divisent en trois grandes catégories : les récepteurs membranaires de type
Toll ou TLRs (*Toll-like receptors*), les récepteurs de type Nod ou NLRs (*Nod-like receptors*)
et les cytoplasmiques de type RIG ou RLRs (*RIG-I-Like Receptors*) (Kumar et al., 2011).

1225 Les NLRs permettent la détection de dérivés d'origine bactérienne. Ils ne seront pas
1226 détaillés dans ce manuscrit.

Les TLRs sont exprimés au niveau des cellules du système immunitaire (cellules dendritiques, macrophages, polynucléaires, lymphocytes B et T) ou bien de cellules en contact avec l'extérieur de l'organisme (peau, cellules épithéliales pulmonaires et intestinales). Ils peuvent se retrouver à la surface des cellules, au niveau de la membrane plasmide ou bien en intracellulaire comme au niveau de la membrane de l'endosome (**tableau** 5).

La localisation subcellulaire des TLRs est souvent associée à l'origine des PAMPs qu'ils
reconnaissent. Les TLRs 1, 2, 4, 5, 6, sont localisés à la membrane plasmique et reconnaissent
des PAMPs extérieurs à la cellule. Les TLRs 3, 7, 8 et 9 localisés au niveau de la membrane
endosomale, reconnaissent des acides nucléiques.

Récepteur TLR	Ligands	Protéine adaptatrice
TLR1	Triacyl des lipoprotéines	MyD88/MAL
TLR2	Lipoprotéine, peptidoglycane (bactéries Gram+), acide lipotéichoïques, champignon, glycoprotéines virales	MyD88/MAL
TLR3	ARN double brin d'origine virale ou parasitaire	TRIF
TLR4	Lipopolysaccharide (bactéries Gram-), glycoprotéines virales	MyD88/MAL/TRIF/TRAF
TLR5	Flagelline de bactérie	MyD88
TLR6	Diacyl lipopeptides de mycobactérie	MyD88/MAL
TLR7	ARN simple brin viral	MyD88
TLR8	ARN simple brin viral	MyD88
TLR9	ADN hypométhylyés (motifs CpG) bactériens	MyD88
TLR10	Non connu	Non connu

1237 <u>Tableau 5 :</u> Les différents TLRs et leurs PAMPs chez l'homme (Adapté de (Kumar et al., 2011)).

1239

1240 Enfin, les récepteurs cytoplasmiques RIG-I (helicase receptor retinoic acid-inducible-1241 associated protein I) et MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene 5) sont exprimés 1242 dans un grand nombre de cellules dont les cellules myéloïdes, épithéliales ou du système 1243 nerveux central. Ils reconnaissent spécifiquement des ARNs porteurs d'un groupe 1244 triphosphate au niveau de l'extrémité 5' et des doubles brins d'ARNs produits lors de la 1245 réplication du virus dans la cellule hôte. Ces récepteurs permettent ainsi à la cellule de repérer 1246 la réplication virale suite à l'infection virale ayant lieu dans son propre cytoplasme et d'agir 1247 directement.

La reconnaissance d'un PAMP par son PRR provoque une transduction intracytoplasmique du signal permettant l'activation de facteurs de transcription permettant l'expression de cytokines. Ces cytokines ont plusieurs fonctions : elles assurent la communication intercellulaire, elles permettent la sécrétion d'interleukines et autres cytokines pro-inflammatoires, la production d'IFN de type I antivirale et enfin, la production de protéines co-stimulatrices assurant la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

Les voies de signalisation induite par l'activation de ces différents PRRs sont différentes
selon la nature des PRRs sollicités (Kumar et al., 2011). Nous détaillerons ici uniquement,
celles concernant la production d'IFN de type I au cours d'une infection DENV.

1257 L'activation de la signalisation dépendante de RIG-I et MDA-5 induit leur translocation au 1258 niveau de la membrane mitochondriale activant alors la molécule liée à la mitochondrie 1259 MAVS (aussi appelée CARDIF, IPS-I ou encore VISA) activant à son tour TRAF3 et TRAF6 1260 aboutissant à la phosphorylation et donc l'activation IRF-3 et IRF-7 jouant eux même le rôle 1261 de facteur de transcription pour la synthèse d'interféron de type I (Acosta et al., 2014). Cette 1262 protéine MAVS serait également exprimée au niveau du peroxysome et permettrait la mise en 1263 place d'une réponse plus précoce via le facteur de transcription IRF-1 (Kumar et al., 2011) 1264 (figure 16).

1265

1266 Deux TLRs sont critiques dans l'initiation d'une réponse innée suite à l'infection par le DENV : TLR3 et TLR7. TLR3 transduit le signal d'activation de façon synergique et 1267 semblable à celui de RIG-I ou MDA-5. Seule la protéine adaptatrice permettant l'initiation de 1268 1269 la transduction du signal est différente : TLR3 est associé à TRIF au lieu de la protéine 1270 MAVS mitochondriale (Uno and Ross, 2018) (figure 16). TLR7 transduit le signal en 1271 activant la protéine adaptatrice MyD88 qui recrute et active alors la kinase IRAK4 1272 phosphorylant et activant à son tour IRAK1 et 2. Ces protéines, associées à TRAF6 (TNF-1273 receptor-associated factor 6) l'active et TRAF6 s'auto-ubiquitine afin de migrer alors au 1274 noyau où il joue un rôle de facteur de transcription en promouvant l'expression de gène 1275 assurant la phosphorylation de l'IRF-7 (Interferon regulatory factor 7) induisant la 1276 transcription d'IFN α (Kumar et al., 2011).



1277 <u>Figure 16 :</u> Représentation des voies d'induction de l'expression de l'IFN-I suite à la
1278 reconnaissance d'ARNs double brin : RIG-I, MDA-5 et TLR3 (Traduit et adapté de
1279 (Acosta et al., 2014)).

1280 La reconnaissance d'ARNs double brin par RIG-I, MDA-5 et TLR3 induit, respectivement, par les
1281 voies MAVS et TRIF dépendantes, l'expression d'IFN de type 1.

1282

1283 Les IFN de type I constituent une famille de plusieurs protéines de type α et une 1284 unique protéine de type β . Ces protéines, produites par des cellules infectées, peuvent se fixer 1285 de façon auto ou paracrine sur les récepteurs IFNAR exprimés à la surface des cellules 1286 (Acosta et al., 2014). Plus précisément, l'IFN α/β produit se fixe sur son récepteur qui est 1287 présent à la surface des cellules sous forme monomérique et provoque ainsi son 1288 hétérodimérisation (récepteur à deux sous unités IFNAR1 et IFNAR2) et son activation. S'en 1289 suit l'activation des protéines tyrosines kinases qui sont associées à ce récepteur : JAK1 1290 (Janus 1) et TYK2 (Tyrosine Kinase 2). Ces protéines kinases sont alors capables de 1291 phosphoryler les résidus tyrosines de protéines de transduction du signal et d'activation des 1292 protéines STAT1 et STAT2 (signal transducers and activors of transcription). 1293 L'hétérodimérisation de ces dernières permet leur association à la protéine de fixation à 1294 l'ADN, IRF-9 (Interferon Regulatory Factor-9) pour former le complexe ISGF-3 (IFN-1295 stimulated gene factor 3). Ce complexe multiprotéique transloque alors au noyau, se fixe au 1296 niveau d'une séquence consensus ISRE (Interferon-Stimulated Response Element) et induit la transcription de certains gènes qualifiés de gènes de réponses à l'IFN : les ISGs (*Interferon Stimulated Genes*) (Figure 17).

Ces IFN-I permettent ainsi de stimuler l'expression de plus d'une centaine de gènes impliqués dans l'initiation d'un état antiviral à la fois dans la cellule infectée elle-même ou bien dans les cellules saines de son environnement (Schneider et al., 2014). Ces états sont marqués notamment par une augmentation des capacités apoptotiques et de l'expression des molécules présentatrices d'antigènes (CMH-I) des cellules infectées favorisant aussi la réponse adaptative.



1305 <u>Figure 17 :</u> Voie de signalisation en aval du récepteur à l'IFN-I.

La fixation de l'IFN de type I sur le récepteur IFNAR induit son hétérodimérisation. La transduction
du signal se fait par activation des protéines kinase Tyr2 et Jak1 qui phosphorylent à leur tour STAT1
et STAT2. La phosphorylation de STAT1 et STAT2 permet leur hétérodimérisation et leur association
avec IRF9. Ce complexe transloque au noyau où il active la transcription de gènes de réponse à
l'IFN.

1311

La présence d'ARNs double brin, phase obligatoire lors de la réplication de virus à ARN comme le DENV, fait qu'en plus des TLR7, la réplication du DENV pourra être détectée par le TLR3, RIG-I et MDA-5 (**tableau 5**). De façon intéressante, la production d'IFN, suite à une infection DENV, par les cellules dendritiques plasmacytoïdes est médiée 1316 par la reconnaissance de l'ARN viral par le récepteur endosomal TLR7. Il a été montré que 1317 cette reconnaissance est dépendante de l'internalisation des particules virales par endocytose 1318 et de l'acidification de l'endosome qui permet la fusion des membranes endosomales avec 1319 celle des particules virales (Sun et al., 2009; Wang et al., 2006). Les récepteurs aux ARNs 1320 double brin comme TLR3, RIG-I et MDA-5 sont également impliqués dans le contrôle de 1321 l'infection au DENV. En effet, il a été montré que l'inhibition d'expression de ces récepteurs 1322 favorise la propagation de l'infection (Liang et al., 2011; Nasirudeen et al., 2011) et que leur 1323 expression est augmentée suite à l'infection virale (da Conceicao et al., 2013; Sun et al., 2009; 1324 Torres et al., 2013; Tsai et al., 2009).

1325

1326 Lors de l'infection par le DENV, parmi les protéines induites par l'IFN, les protéines 1327 2'5'-oligoadenylate synthases (OAS) ont été montrées in-vitro, comme capables d'inhiber le 1328 cycle de réplication virale en ajoutant des groupements adénylates de type 2'-5' sur les ARNs 1329 viraux qui seront ensuite reconnus par une ribonucléase (RNAse-L) dégradant les ARNs. 1330 (Peisley and Hur, 2013). Les OAS sont un groupe d'enzymes encodées par quatre gènes 1331 pouvant, pour certains, êtres à l'origine de différents isoformes résultant d'un épissage 1332 alternatif. Ainsi, l'OAS1 encode les formes p42, p44, p46, p48 et p52, OAS2, code les formes 1333 p69 et P71, et enfin, OAS3 code l'isoforme p100. Ces enzymes reconnaissent les ARNs 1334 simple ou double brin et produisent des oligoadénylates branchés en 2'-5' qui activent à leur 1335 tour les ribonucléases L qui vont être directement responsables de la dégradation des ARN 1336 viraux.

De façon intéressante, il a été montré en clinique que dans le cas d'une infection DENV, les
polymorphismes associés au gène OAS (gènes OAS 1, OAS 2 ou OAS 3) étaient corrélés à
des sévérités pathologiques différentes. Les mécanismes à l'origine de ces corrélations
semblent aujourd'hui encore inconnus (Alagarasu et al., 2013).

1341

1342 Physiologiquement, la production et sécrétion d'IFN est un processus finement régulé 1343 dans nos cellules. En effet, lors de l'activation de cette voie, la cellule se retrouve dans un état 1344 d'arrêt métabolique et fonctionnel pouvant aboutir à sa mort si le problème ayant été initiateur 1345 de l'activation de la voie IFN n'arrive pas à être résolu. Aussi, des processus de rétrocontrôles 1346 sont notamment déployés par la cellule afin d'empêcher des réactions inappropriées pouvant 1347 mener au développement de pathologies auto-immunes. Le principal mécanisme de ce 1348 rétrocontrôle passe par SOCS (Suppressor Of Cytokines Signaling), protéine induite par la 1349 sécrétion d'IFN elle-même, qui va se fixer sur les protéines JAK ainsi que sur les récepteurs à 1350 l'IFN empêchant ainsi la voie de signalisation en aval d'être suractivée (figure 18)
1351 (Yoshimura et al., 2004).



1352 Figure 18 : Rétrocontrôle de l'IFN.

La sécrétion d'IFN est un processus finement régulé pour éviter une suractivation nocive
pour l'organisme. L'expression d'IFN active l'expression de SOCS, protéine qui inhibe par
interaction, les protéines JAK intervenant dans la voie de signalisation de production de
l'IFN.

1357

2) Les autres mécanismes de contrôle de l'infection virale

1358

1359D'autres voies sont également importantes dans le contrôle de l'infection DENV : le1360système du complément, l'autophagie, l'apoptose et les ARNs interférants (ARNi).

1361 Le système du complément ou MBL (Mannose-binding lectin) assure une protection par 1362 reconnaissance des résidus mannose contenus dans la membrane du virion du DENV. En 1363 effet, grâce à l'activité protéase de la protéine MASP-2 (*MBL-associated serine protease-2*) 1364 associée au MBL, il y a clivage de composés sanguins C4 et C2. Ces composés se déposent et 1365 s'associent alors à la surface de la particule virale permettant ainsi la formation de la C3 1366 convertase puis la C5 convertase, elle-même responsable de la formation du complexe 1367 d'attaque membranaire MAC (C5b-9 membrane attack complex). Ce complexe neutralise la 1368 particule virale et la libération des C3a et C5a promeuvent l'inflammation facilitant le 1369 recrutement de cellules de l'immunité (Figure 19) (Uno and Ross, 2018).



- 1370 <u>Figure 19 :</u> Le contrôle de l'infection par le système du complément (D'après (Uno and
 1371 Ross, 2018)).
- 1372

1373 L'autophagie est un moyen de contrôle de l'homéostasie cellulaire et d'élimination de 1374 pathogènes externes comme les virus par fusion de l'endosome, permettant l'entrée du 1375 pathogène avec le lysosome. Cependant dans le cas d'une infection par le DENV, bien que 1376 l'autophagie soit activée, son rôle dans l'évolution de la pathologie (pro ou antivirale) 1377 varie selon le type cellulaire étudié et le contexte dans lequel l'infection a lieu. Alors qu'elle 1378 permet une inhibition de la réplication dans les cellules monocytaires en participant 1379 possiblement à la présentation d'antigène (Panyasrivanit et al., 2011), elle permet dans 1380 d'autres cas, dans ces mêmes cellules, de faciliter l'infection lorsqu'elle est médiée par 1381 anticorps facilitant (Fang et al., 2014). La reconnaissance de la partie constante des anticorps 1382 par les récepteurs Fcy permet l'entrée du virus dans ces cellules (ce principe sera expliqué 1383 plus en détails dans le chapitre 3 partie VI-1) de l'introduction).

1384 Dans les cellules hépatiques, l'autophagie est utilisée par le DENV pour faciliter sa 1385 réplication. L'autophagosome est détourné alors comme vésicule de réplication via la protéine 1386 AGT5 (Autophagy related 5), une E3 ubiquitine ligase, permettant l'allongement du phagophore en un phagolysosome (Lee et al., 2008). Dans ces mêmes cellules, l'autophagie 1387 1388 assure la maturation des particules formées (Mateo et al., 2013) puisque le traitement avec de 1389 la spautin-1 (Specific and Potent Autophagy inhibitor 1), un inhibiteur spécifique de 1390 l'autophagie, rend les particules sensibles à la chaleur et non contagieuses. Enfin, 1391 l'autophagie, et plus précisément les vésicules infectieuses associées aux vésicules 1392 d'autophagie, permettent au DENV d'échapper à la neutralisation par des anticorps lors de 1393 son exocytose et ainsi d'infecter de nouvelles cellules. Contenant à la fois des protéines (E, 1394 prM/M, NS1) et ARN viraux mais aussi des éléments dérivants de l'hépatocyte infecté 1395 (gouttelettes lipidiques et des marqueurs d'autophagie LC3-II), ces vésicules ne sont pas 1396 reconnues par les anticorps neutralisant le DENV protègeant ainsi le DENV (Wu et al., 2016). 1397 L'apoptose permet d'éliminer les cellules anormales pouvant être dangereuses pour un 1398 organisme telles que des cellules cancéreuses ou des cellules infectées. L'infection par le 1399 DENV induit l'apoptose des cellules hépatocytaires, HepG2, infectées : l'interaction de la 1400 protéine de capside virale avec la protéine DAXX 6 (Death Domaine Associated Protein 6) 1401 induit l'activation de la voie apoptotique intrinsèque dépendante de FAS (Netsawang et al., 1402 2010). De même, la protéine NS3 protéase ou bien son précurseur NS2B-NS3 sont également 1403 capables d'induire l'apoptose (Shafee and AbuBakar, 2003).

1404 Les ARN interférants (siARN) et microARNs (miARN) permettant la dégradation 1405 d'ARN par le complexe RISC et Argo semblent également jouer un rôle dans le contrôle de 1406 l'infection par le DENV. Dans des cellules hépatocytaires HuH7, l'inhibition de protéines 1407 essentielles à la génération et action de ces ARNs (Dicer, Drosha, Argo) augmente 1408 significativement le titre viral des cellules (Kakumani et al., 2013). Les miARNs modulent 1409 l'infection DENV notamment miRNA-146a permettant suite à une infection DENV de 1410 diminuer l'expression de TRAF6 permettant d'inhiber l'autophagie induite par le virus et 1411 contrôler l'inflammation dont l'activation excessive pourrait être délétère aux cellules (Pu et 1412 al., 2017).

1413

II. Les virus interfèrent avec les voies de l'immunité innée

1414

1415 La capacité des virus à bloquer la première ligne de défense immunitaire chez
1416 l'Homme est cruciale pour permettre une infection efficace.

1417 Aussi, un grand nombre de virus bloquent la voie d'activation de l'IFN afin de ne pas induire 1418 les mécanismes de l'immunité pouvant limiter la réplication virale et ce par des mécanismes 1419 des plus divers. Ils peuvent soit bloquer la sécrétion d'IFN ou la transduction du signal 1420 principalement par blocage de la voie de signalisation JAK/STAT. De plus, il a été montré in-1421 *vitro* qu'un prétraitement à l'IFN α/β ou IFN γ de cellules HepG2 avant une infection par le 1422 DENV protégeait ces cellules de la réplication du virus (Diamond et al., 2000). En revanche, 1423 ce même traitement s'avère être inefficace s'il est effectué post-infection. Ceci indique que 1424 même si l'IFN est important dans le contrôle de l'infection au DENV, le virus est capable de 1425 manipuler la signalisation IFN et d'inhiber son action afin d'assurer une infection efficace.

1426Dans le cas du DENV, des études ont montré que le virus était capable d'échapper aux1427mécanismes de l'immunité innée en bloquant l'activité de l'IFN-I. Certaines protéines du

DENV vont en effet être capables de bloquer la transduction du signal IFN mais aussi dans la production de la cytokine elle-même. Dans le cas de dengue hémorragique, l'infection inactiverait indirectement SOCS-1 en augmentant l'expression de miR-150 inhibant lui-même SOCS-1. N'ayant plus de rétrocontrôle, il y a emballement de la réponse inflammatoire avec une sécrétion importante d'IFN responsable de la fuite plasmatique observée dans les formes hémorragiques sévères (Chen et al., 2014).

1434 Pour bloquer la production de l'IFN, il a été identifié que la protéine NS5 méthyle 1435 l'extrémité 5' du génome viral et le protège d'une détection par RIG-I (Chang et al., 2016). 1436 NS3 et NS4A bloquent également la transduction du signal induit par RIG-I empêchant ainsi 1437 la synthèse d'IFN en liant respectivement la protéine 14-3-3 e responsable de la translocation 1438 de RIG-I à la mitochondrie (Chan and Gack, 2016) ou directement le domaine d'interaction 1439 de MAVS avec RIG-I (He et al., 2016). Le complexe protéique NS2B-NS3 protéase clive et 1440 ainsi induit la dégradation du facteur STING (Stimulator of IFN Genes), facteur intervenant 1441 normalement dans la voie de transduction du signal d'IRF3 et permettant notamment l'expression de l'IFN β (Aguirre et al., 2012; Yu et al., 2012). 1442

1443 Concernant, la transduction du signal IFN, la protéine NS4B et dans une moindre 1444 mesure les protéines NS2A et NS4A sont capables d'inhiber la voie de l'IFN en empêchant la 1445 phosphorylation de STAT1. STAT1 ne peut donc plus transloquer au noyau et ne peut donc 1446 plus jouer son rôle de facteur activateur de la transcription des gènes de réponse à l'IFN 1447 (Munoz-Jordan et al., 2003). Dans la même idée, la protéine NS5 en liant simultanément la 1448 protéine STAT2 et la protéine UBR4, une E3 ubiquitine ligase, promeut l'ubiquitination de 1449 STAT2, l'adressant ainsi au protéasome et conduisant à sa dégradation (Morrison et al., 1450 2013).

Un autre mécanisme de contrôle est l'inhibition des protéines impliquées dans la genèse et fonctionnement des ARNi : la protéine NS4B a été montrée pour bloquer l'action de DICER empêchant ainsi la formation de miRNA (Kakumani et al., 2013) tandis que la protéine NS3 par fixation à la protéine HSC70 (*Heat Shock Cognate 70*), protéine du complexe RISC, inhibe l'association avec Argo empêchant ainsi la dégradation des ARNs (Kakumani et al., 2015).

1457 La sécrétion de la protéine NS1 est également un autre moyen pour le DENV 1458 d'échapper à la neutralisation par le système de complément MBL. En effet, la protéine 1459 sécrétée en se liant à MBL inhibe la polymérisation du système C9-MAC et protège ainsi les particules virales de la dégradation (Thiemmeca et al., 2016). De plus, la reconnaissance par
TLR4 de cette protéine NS1 (Modhiran et al., 2017) favorise la production de cytokine proinflammatoire délétère pour l'organisme en contribuant ainsi à la perméabilité vasculaire
(Chao et al., 2019; Modhiran et al., 2015). Cet effet est accentué par la diffusion et la fixation
de NS1 sur des récepteurs de cellules non infectées et distantes du site de primo-infection
(Avirutnan et al., 2006).

1466

1467 Une autre stratégie, plus générale, développée par le DENV pour échapper à la 1468 reconnaissance par les PRRs, est la soustraction physique des PAMPs à ces récepteurs. Ainsi 1469 le DENV limite la production d'IFN-I par la création de vésicules intracellulaires issues de 1470 déformations de la membrane du RE dans lesquelles le processus de réplication est confiné. Comme déjà évoqué, la constitution de ces « virales factories » serait ainsi un moyen pour le 1471 1472 virus de générer non seulement des structures nécessaires à sa réplication mais également de 1473 générer un microenvironnement intracellulaire favorable, qui « masquerait » ces structures 1474 aux récepteurs de l'immunité innée de l'hôte (Fernandez-Garcia et al., 2009).

Chapitre 3 : Le DENV, un exemple d'arbovirus

- 1475 I. Les Arbovirus
- 1476

1477 Le terme *Arbovirus* est l'acronyme anglo-saxon pour ARthropod-BOrne VIRUSes.
1478 Les arbovirus correspondent à un ensemble de virus dont les vecteurs sont des arthropodes
1479 hématophages comme les tiques, les moustiques ou les phlébotomes. Ce groupe rassemble
1480 des virus issus de diverses familles.

1481II. Le DENV, un membre de la famille des *flavivirus*

1482 **1)** Une famille de virus principalement transmis par les moustiques

1483

1484 Les *flavivirus* sont des virus appartenant à la famille des *Flaviviridae*, famille 1485 regroupant les *hepacivirus*, les *pestivirus*, les *flavivirus* et les *pegivirus* (Figure 20).



1486 <u>Figure 20 :</u> Arbre phylogénétique des *Flaviviridae* (D'après (Douam et al., 2015)).

1487

Dans le genre des *flavivirus*, nous retrouvons plus de 70 virus à ARNs simple brin de polarité positive transmis par les moustiques ou les tiques. Les plus virulents sont souvent ceux transmis par les moustiques et sont responsables de plusieurs pathologies sévères constituant des inquiétudes majeures en santé publique comme le virus zika, le virus JEV (Virus de l'encéphalite japonaise), le WNV (Virus West Nile ou virus du Nil occidental) et le DENV (**figure 21**).



Groupe tiques dures

1494 <u>Figure 21 :</u> Arbre phylogénétique de la famille des *flavivirus* généré après alignement 1495 des séquences génétiques complètes des virus (D'après (Beck et al., 2013)).

1496 WNV : Virus West Nile, JEV : Virus de l'encéphalite japonaise, USUV : Virus Usutu, MVEV : Virus

1497 de l'encéphalite de la Murray Valley, ALFV : Virus Alfuy, NTAV : Virus Ntaya, DENV : Virus de la

1498 dengue, YOKV: Virus Yokose, CFAV: Virus reponsable de la fusion cellulaire, KRV: Virus de la

1499 rivière Kamiti, MMLV: Virus de la leucoencéphalite Montana Myotis, RBV: Virus Rio Bravo,

1500 MODV: Virus Modoc, APOIV: Virus Apoi, MEAV: Virus Meaban, SREV: Virus Saumarez Reef,

1501 TYUV: Virus Tyuleniy, KSIV: Virus Karshi, POWV: Virus Powassan, DTV: Virus Deer Tick,

1502 ALKV: Virus Alkhurma, LGTV: Virus Langat, OHFV: Virus de la fièvre hémorragique Omsk,

1503 *TBEV* : Virus de l'encéphalite à tiques, LIV : Virus Louping Ill, YFV : Virus fièvre jaune.

1504 Deux groupes extérieurs ont été utilisés : HCV (Virus de l'hépatite C ; genre Hepacivirus, famille des

1505 Flaviviridae) et BVDV (Virus de la diarrhée bovine ; genre Pestivirus, famille des Flaviviridae). Les

1506 numéros d'accession GenBank sont indiqués au bout de chaque branche de l'arbre.

1507

1508Comme indiqué précédemment, les *flavivirus* sont principalement transmis par des1509moustiques du genre *Aedes*, plus connus sous le nom populaire de moustiques tigres lié à1510l'aspect zebré de leur abdomen (Figure 22).



1511 Figure 22 : Photographie de moustique du genre Aedes.

1512

- 1513
- 1514

2) Les cycles d'infection du DENV chez l'homme et les primates nonhumains

En plus d'une transmission possible du DENV des moustiques à leur descendance et partenaires par transmission trans-ovarienne ou transmission verticale (Rosen et al., 1983; Sanchez-Vargas et al., 2018), et vénérienne par accouplement entre un moustique infecté et un moustique sain respectivement (Sanchez-Vargas et al., 2018), le DENV peut être transmis à de nombreux vertébrés hôtes dont deux cycles d'écologie ont été identifiés : un cycle humain ou urbain et un cycle primates non-humains (PNH) ou sylvatique (forestier) (Hanley et al., 2013).

La transmission du DENV est permise comme expliquée plus haut, majoritairement, par la piqûre d'un moustique du genre *Aedes*. De nombreuses espèces différentes existent et seront différemment localisées en fonction des zones urbaines, rurales ou forestières (figure Le cycle sylvatique concerne l'infection des PNH. L'infection chez ces primates n'induit pas les mêmes conséquences sur les individus infectés et n'est probablement pas liée aux mêmes sérotypes que les DENV humains (Vasilakis et al., 2011; Weaver and Vasilakis, 2009).

1529 Ces virus ne peuvent pas être transmis d'homme à homme directement sauf 1530 accidentellement par voie parentérale et lors de greffes d'organe provenant d'un individu 1531 malade (Rosso et al., 2018). Aucune transmission directe d'homme à singe n'a été décrite ; 1532 cependant des souches virales de zones sylvatiques ont été isolées non seulement dans des 1533 moustiques de zones urbaines (Johari et al., 2019) mais également à partir de sérum de 1534 patients (Cardosa et al., 2009; Franco et al., 2011; Teoh et al., 2010; Vasilakis et al., 2010).

En revanche, il est clairement établi que le virus peut être transmis à un moustique naïf femelle suite à une prise alimentaire chez un homme infecté. Après une période d'incubation comprise entre 4 et 10 jours, cette femelle pourra transmettre le virus à d'autres personnes par piqure. Un homme infecté peut, quant à lui, transmettre le virus à un moustique en moyenne

- dans les 4 à 5 jours après apparition des premiers symptômes de la maladie et jusqu'à 12 jours
- 1540 au maximum (d'après l'Organisation Mondiale de la Santé, https://www.who.int).



1541 <u>Figure 23 :</u> Cycle urbain et sylvatique de transmission du DENV (Adapté et traduit de 1542 (Vasilakis et al., 2011)).

Le DENV est transmis par des moustiques de genre Aedes (Ae.) dont différentes espèces sont rencontrées en fonction de la zone étudiée. Les espèces Ae. Lutechephalus, furcifer et niveus se retrouvent dans les zones forestières et les jungles, Ae. furcifer et albopictus au niveau des zones rurales de transition et Ae. albopictus, aegypti et polynensiensis dans les zones urbaines. Toutes ces espèces ne se retrouvent pas dans toutes les régions du globe (leur localisation est précisée entre parenthèses à côté de leur nom). Les moustiques peuvent transmettre le DENV à leur descendance par transmission verticale (TV) mais aussi lors de l'accouplement par transmission vénérienne (TVN).

1550 Ainsi, le DENV fait partie de ce groupe des arbovirus et est capable d'infecter un 1551 grand nombre de cellules de différentes espèces mais ne peut se répliquer que dans certains 1552 types cellulaires. Chez l'homme, la réplication du DENV est active dans les cellules de la 1553 peau (Cerny et al., 2014; Wu et al., 2000), du sang (Nakao et al., 1989), de la rate (Blackley et 1554 al., 2007; Prestwood et al., 2012), des ganglions lymphatiques (Balsitis et al., 2009; 1555 Prestwood et al., 2012), et du foie (Huerre et al., 2001; Mohan et al., 2000), en ayant comme 1556 principal vecteur le moustique du genre Aedes (Aedes aegypti et Aedes albopictus chez 1557 l'homme).

3) Les moustiques et leur résistance

Le DENV est capable d'infecter, comme nous l'avons dit au paragraphe précédent, un large panel de types cellulaires *in-vitro* mais aussi des cellules issues d'espèces différentes comme les cellules murines, de chevaux (Beck et al., 2019), de chien (Thongyuan and Kittayapong, 2017) et bien entendu *in-vivo* des cellules de moustiques, humaines et de singes.

1564

1565 Chez l'homme, lors de la piqure le virus infecte en premier les cellules de Langerhans peuplant les tissus cutanés de l'homme (Wu et al., 2000). Les principales cibles du virus sont 1566 1567 en fait les cellules immunitaires : des monocytes/macrophages ainsi que les lymphocytes B et 1568 T. Les cellules endothéliales sont aussi susceptibles d'infections et contribuent à l'aggravation 1569 de la pathologie en induisant notamment des fuites plasmatiques aboutissant à des 1570 hémorragies. D'autres cellules d'origine non-hématopoïétiques sont également des sites de 1571 réplication du DENV notamment les cellules du foie (cellules de Kupffer, macrophages 1572 spécifiques du foie mais aussi les hépatocytes eux-mêmes) ainsi que des cellules cérébrales 1573 (microglie ou macrophages spécifiques du cerveau et les neurones) (Balsitis et al., 2009).

1574 Chez les moustiques, le DENV infecte premièrement leur estomac. Il se réplique et se 1575 dissémine ensuite dans l'organisme jusqu'aux glandes salivaires (Raquin and Lambrechts, 1576 2017; Salazar et al., 2007) pour y être transmis à l'hôte via la salive au moment de la piqûre. 1577 Contrairement aux infections dans les cellules de mammifères cibles, la réplication du DENV, 1578 et d'ailleurs comme pour la plupart des arbovirus, induit dans le vecteur moustique, une 1579 infection durable et non pathogénique (Mukherjee et al., 2019). Ainsi, les moustiques infectés 1580 ne mourant pas suite à l'infection, transmettront le virus tout au long de leur vie. La 1581 persistance du virus dans les cellules des arthropodes est permise par la mise en place de 1582 différentes stratégies antivirales comme l'activation de voies antivirales (telles que 1583 l'activation de la réponse type Toll, de la voie Jak/STAT et Jnk) (Ramirez and Dimopoulos, 1584 2010) permettant de produire des peptides anti-microbiaux (Luplertlop et al., 2011), 1585 l'activation de protéines du complément qui, par reconnaissance du flavivirus augmente 1586 également l'expression de peptides anti-microbiaux (Cheng et al., 2011; Xiao et al., 2014) et 1587 l'utilisation de petits ARNs (comme les siARN) formés à partir d'ARNs double brin viraux 1588 reconnus et clivés par Dicer qui à leur tour reconnaissent les ARNs viraux et les dégradent par 1589 Argonaute (Goic et al., 2016).

1590 Ces mécanismes permettent de maintenir une charge virale faible, détectable dans1591 l'hémolymphe du moustique mais insuffisante pour engendrer sa mort.

III. Développement du nombre d'infection par le DENV

1593

1594 Même si le réchauffement climatique est souvent pointé du doigt comme le principal 1595 responsable de l'accroissement des zones à risques d'infection au DENV, aucun travail 1596 scientifique approfondi n'a pu attribuer son rôle déterminant dans la propagation du virus. En 1597 revanche, l'accroissement et l'installation des populations humaines dans des zones 1598 inhabituelles accompagnée de phénomènes d'industrialisation, d'urbanisation et de 1599 déforestation en augmentant le nombre de bidonvilles, a été montrée pour avoir un impact 1600 beaucoup plus significatif sur la propagation du virus en favorisant les zones d'eau stagnante 1601 permettant la reproduction et la survie du vecteur moustique (Barclay, 2008; Gubler et al., 1602 2001; Mazine et al., 1996; Moore et al., 1978; Thammapalo et al., 2008). Par ailleurs, les 1603 mutations des souches du DENV circulantes ont permis l'émergence de souches beaucoup 1604 plus virulentes malgré un sérotype identique (par exemple les souches de DENV2 et DENV3 1605 isolées aux Amériques ont été montrées pour être moins virulentes que celles d'Asie). Ce 1606 phénomène est d'autant plus inquiétant que les souches les plus virulentes dont l'impact 1607 épidémiologique est le plus fort auraient tendance à supplanter celles dont la virulence est 1608 faible et dont l'impact sociétal serait moindre (Gubler, 1998a; Gubler and Rosen, 1977; Rico-Hesse, 2003). 1609

1610 Enfin, les voyages jouent un rôle majeur dans la propagation du virus : même si des 1611 moustiques porteurs de la maladie peuvent être emmenés lors de voyage en avion, les mesures 1612 prises pour diminuer la proportion des moustiques dans les aéroports (par utilisations 1613 d'insecticides notamment) font que le risque majeur résiderait plus dans les voyages de 1614 personnes infectées (voyages d'affaires, réfugiés, immigrants, voyages à but touristique mais 1615 aussi de troupes de soldats provenant de diverses zones du monde). Ces personnes constituent 1616 alors de nouveaux foyers infectieux qui seront sources d'infection pour des moustiques 1617 endémiques de leur pays d'origine ou d'accueil et responsables de la propagation de la 1618 maladie à de nouvelles populations (Benedict et al., 2007; Cummings et al., 2004; Wilson and 1619 Freedman, 2007).

1620

1621 L'impact simple d'un seul de ces paramètres sur la propagation du virus est impossible 1622 à évaluer tant les causes de développement du vecteur sont multiples. Toutes ces raisons font 1623 du DENV un problème de santé publique mondial majeur dont la menace est présente dans 1624 plus de 100 pays en particulier dans les zones tropicales et subtropicales.



1625 **Figure 24 :** Distribution du DENV dans le monde en 2016 d'après WHO.

1627 Même si ce moustique est plutôt responsable d'une transmission du chikungunya 1628 (autre *arbovirus* du genre des *Alphavirus* transmis par les moustiques du genre *Aedes*), 1629 l'Europe a déjà connu une crise de cas de DENV lorsque le moustique Aedes aegypti était 1630 présent (Gubler, 1998b). Cependant, en Europe, le moustique du genre Aedes albopictus, dont 1631 la capacité à résister à des températures plus froides que les individus de l'espèce Aedes 1632 aegypti, a été identifié dans les années 80-90 en Albanie, en Italie et dans le sud de la France (Côte d'Azur et Corse) (Beck et al., 2013; Johnson et al., 2018; Rodhain, 1993; Rodhain, 1633 1634 1995).

1635 Aujourd'hui plusieurs territoires de France font face à la présence du virus et de son vecteur. Les territoires d'outre-mer comme la Guyane, la Guadeloupe ont une épidémie en 1636 1637 cours avec comme sérotype circulant majoritaire le sérotype 2. A Saint-Martin également, 1638 mais le sérotype circulant est majoritairement le 1. A Saint-Barthélemy, les cas sont plus 1639 sporadiques. Mayotte et l'ile de la Réunion font face à une épidémie importante avec 1500 cas 1640 de dengue signalés sur l'île du 13 au 19 avril de cette année par l'Agence Régionale de Santé 1641 (sources ARS et Santé Publique France). A l'heure actuelle, ce moustique est présent dans 1642 plus de 50 départements de France métropolitaine (figure 25). L'année dernière, en septembre, dans la région Rhône-Alpes (Calcuire-et-Cuire, près de Lyon), l'Agence 1643 1644 Régionale de Santé (ARS) a rapporté le premier cas de DENV autochtone.



1645 <u>Figure 25:</u> Carte d'implantation du moustique *Aedes albopictus* en France
1646 métropolitaine, 2018 (D'après le site : https://solidarites-sante.gouv.fr).

IV. Origine du DENV et manifestations cliniques de la pathologie

1648

1649 Le DENV semble avoir une histoire évolutive récente dont l'origine est estimée à 1650 environ 1000 ans avant l'an 2000 et dont la transmission à l'homme n'a eu lieu qu'il y a une 1651 centaine d'années (Holmes and Twiddy, 2003). Il a été pour la première fois clairement 1652 identifié en 1943 par Ren Kimura et Susumu Hotta à partir d'un échantillon sanguin de 1653 patient au cours de l'épidémie de dengue qui affecta la ville de Nagasaki au Japon. Cette 1654 souche est de nos jours toujours utilisée pour les études in-vitro de réplication virale et a été 1655 nommée Mochizuki, en référence au nom du patient chez qui cette souche a été 1656 historiquement isolée (Hotta, 1952). Elle correspond aujourd'hui au DENV du premier 1657 sérotype.

1658 Même si 50 à 100 millions de nouveaux cas d'infection sont rapportés chaque année, la plupart sont asymptomatiques. Seuls 500 000 évolueront vers des pathologies plus sévères 1659 1660 se traduisant par des symptômes types grippaux également connues sous le terme de « fièvre 1661 de la dengue» (DF) jusqu'à la forme la plus grave de la maladie se traduisant par un 1662 syndrome hémorragique de fuites plasmiques (DHF et DSS) entrainant le décès (environ 1663 25 000 cas annuellement). Le risque sanitaire est lié à l'importante proportion d'individus 1664 susceptibles d'être infectés. Il est estimé entre 2,5 à 3 milliards pour l'infection par le DENV. 1665 L'absence de traitements efficaces dans ces cas mortels, de vaccins pouvant assurer une 1666 immunité chez les personnes non antérieurement infectées (naïves), ainsi que l'augmentation

de la prévalence de la pathologie dans de plus en plus de pays (plus de 100 pays actuellement)
font de l'infection par le DENV une priorité d'étude. Par ailleurs, l'absence de modèle animal
pertinent limite les recherches sur ce virus et la compréhension de la pathologie qui en
découle.

1671

Dans les cas symptomatiques, l'infection par le DENV se traduit, suite à une courte période d'incubation, par des symptômes grippaux avec notamment des douleurs musculaires et des courbatures, des nausées et des érythèmes cutanés. Pour les formes les plus graves, cette fièvre s'accompagne d'hémorragies au niveau cutané et gingival mais aussi au niveau gastro-intestinal, hépatique pouvant aboutir à une fuite plasmatique intense conduisant au décès (**Figure 26**).



1678 <u>Figure 26 :</u> Manifestions et évolution de l'infection DENV (Traduit de (Coffey et al., 1679 2009)).

1680

1681 Il existe quatre sérotypes de DENV numérotées de 1 à 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-1682 3 et DENV-4). Des analyses de leur séquence protéique ont montré que ces sérotypes 1683 partagent entre 60 et 75% d'identité. Au sein de ces différents sérotypes se trouvent des 1684 formes virales dont les différences sont plus subtiles et appelées génotypes. Ainsi, cinq 1685 génotypes pour DENV-1, six pour DENV-2, cinq pour DENV-3 et quatre pour DENV-4 ont 1686 été identifiés. Les différents génotypes diffèrent d'environ 3% de leur séquence en acides
1687 aminés, 6% au niveau nucléique (Guzman and Harris, 2015; Huang et al., 2014).

1688

1689 Les différents sérotypes sont donc relativement proches tout en étant suffisamment 1690 différents pour que l'infection par l'un d'eux induise une réponse immunitaire efficace contre 1691 cette infection en particulier mais ne le sera pas lors d'une infection ultérieure par un autre 1692 sérotype. Nous devrions donc plutôt parler des DENVs plutôt que du DENV. Une seconde 1693 infection avec un sérotype différent de celui de la primo-infection est très souvent corrélée à 1694 des complications plus sévères de l'infection liées par une incapacité des anticorps produits à 1695 éliminer l'infection virale (Effet Hoskins) et la production d'anticorps qui vont faciliter 1696 l'infection de cellules via l'internalisation de complexes anticorps-virus (phénomène ADE, 1697 Antibody-Dependant-Enhancement).

1698 L'effet Hoskins a été décrit pour la première fois en 1960 et stipule que lors d'une 1699 infection virale, le système immunitaire réagit en produisant des anticorps contre les antigènes 1700 dominants de l'infection rencontrée dans le but de l'éliminer. Lors d'une seconde infection, 1701 par une autre forme virale relativement proche de la première mais suffisamment différente 1702 pour présenter de nouveaux antigènes dominants (comme dans le cas de deux sérotypes de la 1703 dengue), le système immunitaire réactivera sa mémoire immunitaire et produira des anticorps 1704 dirigés contre les antigènes dominants de la primo-infection. La réponse immunitaire est alors 1705 faible car aspécifique de la souche virale et l'infection mal contrôlée ne peut être enrayée 1706 (Figure 27) (Mongkolsapaya et al., 2006).



1707 **Figure 27 :** Illustration du phénomène de Hoskins comme observé dans le DENV.

1708 Le phénomène des anticorps facilitant (ADE) repose sur le principe d'endocytose 1709 facilitée de la particule virale par des anticorps grâce à la reconnaissance de la partie constante des anticorps par des récepteurs Fcγ exprimés à la surface des cellules immunitaires
(comme les lymphocytes B, les cellules NK, les cellules dendritiques et macrophages) (Chan
et al., 2019; Guzman et al., 2013; Halstead et al., 1973; Halstead and O'Rourke, 1977; Peiris
and Porterfield, 1979). Nous reviendrons sur ce mécanisme en paragraphe VI.1) de ce
chapitre.

1715

Malgré tout, même en cas de primo-infection, les différents sérotypes sont responsables, du moins en partie, de différents degrés de sévérité de la pathologie : même si le sérotype 2 semble plus associé au développement de formes sévères (Mehta and Shah, 2018; Thomas et al., 2014; Vicente et al., 2016), cette notion est toutefois controversée par d'autres études montrant une absence de corrélation entre sérotype 2 et sévérité de la pathologie et identifiant le plus souvent d'autres sérotypes corrélés au développement de symptômes sévères (Halsey et al., 2012; Rocha et al., 2017; Yung et al., 2015).

1723 La souche virale contractée (asiatique, africaine, américaine..) mais aussi, l'ethnicité, l'âge et

1724 le capital génétique de la personne infectée (Coffey et al., 2009), contribuent également à la

- 1725 sévérité de la pathologie (**Figure 28**). L'évaluation individuelle de l'importance de chacun de
- 1726 ces facteurs est néanmoins difficile.



- 1727 <u>Figure 28 :</u> Facteurs interagissant et déterminant en partie la sévérité du DENV
- 1728 (Traduit de (Coffey et al., 2009)).
- 1729

1730 Initialement transmis dans les cellules dendritiques cutanées au moment de la piqûre, 1731 la propagation du virus à l'ensemble du corps va conduire à une infection de nombreux types 1732 cellulaires. Une étude publiée en 2014 démontre que contrairement à ce qui était au départ 1733 connu dans la littérature et comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, chez l'homme, le 1734 DENV a un tropisme large et est capable d'infecter et éventuellement de se multiplier dans 1735 des cellules immunitaires (monocytes/macrophages) mais aussi des cellules hépatiques, 1736 spléniques, de ganglions lymphatiques, rénales, pulmonaires, cardiaques et même du système 1737 nerveux (Povoa et al., 2014). Les co-morbidités tels que l'obésité et le diabète constituent des 1738 facteurs aggravant la pathologie. L'obésité (Pichainarong et al., 2006) accompagnée d'un foie 1739 gras (NAFLD, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) (Suwarto et al., 2018) favorisant le 1740 développement d'une nécrose hépatique, de formes sévères et d'une trobocytopénie rallongeant ainsi la durée de l'hospitalisation. Le diabète favoriserait l'apparition d'un 1741 1742 syndrôme de détresse respiratoire suite à l'infection (Povoa et al., 2014).

1743 Dans le cas spécifique du foie, les sérotypes 2, 3 et 1 ont été montrés comme 1744 favorisant l'apparition de dommages au niveau de cet organe par augmentation des 1745 concentrations sériques en transaminases (Vazquez-Pichardo, 2006). L'infection DENV est 1746 associée à l'apparition d'un foie déstructuré dépourvu d'endothélium dans lequel se 1747 développe une stéatose (Povoa et al., 2014; Samanta and Sharma, 2015) ainsi que des 1748 nécroses des tissus conduisant à une défaillance hépatique sévère (Estofolete et al., 2019). Cette stéatose est également retrouvée lors d'infection de modèles murins avec le DENV 1749 1750 (Paes et al., 2009; Sakinah et al., 2017).

1751 L'ensemble de ces données montre donc que dans le cas d'une atteinte hépatique par le
1752 DENV, il y a une corrélation étroite entre réplication du virus, gravité de la pathologie et
1753 développement d'une stéatose.

1754 V. Structure du virion et fonctions des protéines virales du DENV

1755

1756 Le virion de DENV se présente sous forme icosahédrale de 50nm (ou 500Å) en 1757 moyenne protégeant un génome viral de 11 000 bases (**Figure 29**).



1758 <u>Figure 29 :</u> Schéma de la structure de la particule virale DENV (Traduit et adapté de 1759 (Jarmer et al., 2014)).

1760 En surface, la particule virale présente une enveloppe lipidique dans laquelle sont enchâssées des

1761 protéines de membrane (prM ou M suivant l'état de maturation) et d'enveloppe (E). Les protéines de

1762 capside (C) s'associent afin de protéger l'ARN génomique du DENV. A l'état immature, les virions

1763 présentent à leur surface des spicules résultant de l'association de trimères de protéines prM:E lui

1764 donnant un aspect rugueux. La maturation de particules virales libère les protéines pr. Les protéines

1765 *M:E restantes s'associent en dimères et la surface du virion devient lisse.*

Le génome de 11 kb que le virion contient s'organise en un brin d'ARN simple de polarité positive encodant trois protéines structurales et sept protéines NS. Il possède au niveau de son extrémité 5' une coiffe de type I (^{7Me}Gppp2'_{OMe}) permettant la reconnaissance par les ribosomes cellulaires pour sa traduction mais ne possède pas de région polyadénylée en 3' (Malet et al., 2008).

1771 Ce génome dispose également à chacune de ses extrémités d'une région très bien 1772 structurée qui sera transcrite mais non traduite appelée UTR (pour *Untranslated region*) de 1773 100 et de 400 à 700 nucléotides en 5 et 3' respectivement et jouant un rôle dans la réplication 1774 virale (Lindenbach and Rice, 2003). En effet, la région 3' a été montrée pour fixer les 1775 protéines cellulaires LA et PTB (*Polypyrimidine-Track-Binding*) facilitant la fixation de

- protéines virales et cellulaires participant à l'initiation de la réplication du DENV (De Nova-Ocampo et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2005).
- 1778 Ce génome n'a qu'un seul cadre de lecture ouvert et code ainsi pour une seule 1779 polyprotéine d'environ 3 391 AA (**Figure 30**). La polyprotéine issue de la traduction du 1780 génome sera ensuite maturée et clivée en différentes protéines dont les fonctions sont décrites 1781 au paragraphe suivant.



1782 Figure 30 : Organisation du virion DENV.

1783 Le génome viral encode une polyprotéine comportant les protéines structurales de capside (C), de
1784 membrane (M) et d'enveloppe (E) mais aussi les sept protéines NS, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A,
1785 NS4B et NS5. A chacune des extrémités du génome se trouve une région transcrite mais non traduite
1786 (UTR) facilitant la transcription du génome viral.

1787

Les protéines structurales de capsides (environ 100 AA), membrane (166 AA pour sa forme précurseur et 75 pour sa forme mature) et d'enveloppe (environ 495 AA) vont constituer les protéines structurales du virus et seront des constituants des particules virales matures circulantes du virus. Les sept protéines NS sont quant à elle, absentes des virions mais seront présentes dans les cellules infectées au niveau des sites réplicatifs du virus.

1) Les protéines structurales

1794 1795

A- La protéine E d'enveloppe

1796 La protéine E est une glycoprotéine de 53 kDa présente à la surface des virions du 1797 DENV, elle est associée à la protéine de membrane (prM puis M). Elle joue un rôle central 1798 dans la liaison aux cellules hôtes et la fusion membranaire. Cette protéine d'enveloppe est 1799 organisée en trois domaines (I, II et III). Le domaine I, charnière entre les deux autres 1800 domaines, assure le changement de conformation de la protéine au moment de l'acidification 1801 du contenu endosomal. Le domaine II, disposant d'une séquence riche en peptides 1802 hydrophobes, assure la dimérisation des protéines E et participe également à la fusion avec la 1803 membrane endosomale. Le domaine III, lui, intervient plutôt dans la phase initiale 1804 d'internalisation de la particule virale dans la cellule cible en étant reconnu par des récepteurs 1805 exprimés à la surface extracellulaire de la membrane plasmique notamment les GAGs grâce 1806 aux résidus lysines en position 291 et 295 (Modis et al., 2005; Watterson et al., 2012; Zhang 1807 et al., 2003a).

Du fait de son enchâssement dans l'enveloppe du virion, elle peut directement interagir avec les récepteurs cellulaires. Par ailleurs, la présence de carbohydrate en position 67 et dans une moindre mesure en position 153 de cette protéine a été identifiée comme essentielle pour l'infection et la production de particules virales infectieuses dans des cellules dendritiques immatures (Mondotte et al., 2007).

Une des différences entre les différentes souches se trouve au niveau de protéines d'enveloppe du virion (Duarte dos Santos et al., 2000; Sanchez and Ruiz, 1996) : la protéine d'enveloppe étant la cible principale des anticorps dirigés contre le virus dans la réponse immunitaire adaptative antivirale.

1817

B- La protéine de membrane prM/M

La protéine prM, évoluant en M par maturation, est une glycoprotéine de 26 kDa. La sous-unité pr est reliée à la sous-unité M de la protéine par un domaine de clivage de furine (Li et al., 2008; Zhang et al., 2003b). La maturation de la protéine prM est corrélée à l'évolution de la surface des virions. Les néo-particules virales sont formées dans le RER et contiennent 60 spicules à la surface. Ces spicules sont initialement formées de trimères de protéines E:prM et vont maturer au cours de leur trajet dans le TGN : la faible valeur de pH dans ce compartiment induit un réarrangement des spicules prM:E de trimères en dimères (Zhang et al., 2012). Le site de clivage de la furine devient alors apparent et la protéase
cellulaire furine coupe la protéine pr:M en pr et M (Zybert et al., 2008). Mais à faible pH, la
protéine pr reste associée à la protéine E l'empêchant ainsi de fusionner avec la membrane
cellulaire (Li et al., 2008; Yu et al., 2009; Yu et al., 2008). Lorsque les virions sont exocytés,
le pH neutre du milieu extracellulaire induit la dissociation de la molécule pr et E achevant la
maturation de la particule (Yu et al., 2009).

1831 C- La protéine de capside, C

1832 La protéine de capside est une protéine de 12 kDa (100 AA). Elle est la première 1833 protéine codée par le génome du virus et est reliée, avant clivage par la protéase NS3, à la 1834 protéine prM par un peptide signal (Byk and Gamarnik, 2016; Zhang et al., 2003a). De 1835 multiples protéines de capside synthétisées s'associent de façon non organisée afin de générer 1836 la nucléocapside (Kuhn et al., 2002; Zhang et al., 2007). La structuration de la nucléocapside 1837 et le recrutement de l'ARN semblent être des processus simultanés bien qu'aucun signal 1838 d'encapsidation n'ait été identifié sur l'ARN viral. La protéine de capside joue alors le rôle de 1839 chaperonnes assurant le repliement de l'ARN dans la capside en cours de formation (Pong et 1840 al., 2011).

1841 Cette protéine est retrouvée sous forme d'homodimères au niveau du cytoplasme 1842 cellulaire où elle est associée à la membrane du RE et aux LDs (Iglesias et al., 2015; Samsa et 1843 al., 2009) mais également au niveau nucléaire (Bulich and Aaskov, 1992; Makino et al., 1844 1989). Les conséquences fonctionnelles de ces associations sont toutefois encore aujourd'hui 1845 peu comprises : l'association aux LDs favoriserait la réplication virale (Samsa et al., 2009) 1846 alors que l'association au noyau régulerait l'apoptose en la favorisant (Li et al., 2012; 1847 Netsawang et al., 2010) ou l'inhibant (Li et al., 2012).

Une association aux lipoprotéines de très faible densité a également été identifiée. Son importance biologique en revanche n'a pas encore été établie, les auteurs évoquent une possible formation de LPVs à l'origine d'une nouvelle voie d'entrée du virus dans les cellules (Faustino et al., 2014).

Enfin la distribution subcellulaire des protéines de capsides apparaît comme contrôlée temporellement au cours de l'infection : des mutations de la séquence codant la protéine de capside induisant une perturbation de la localisation subcellulaire, notamment de l'association aux LDs, ont été montrées pour inhiber la réplication du DENV (Samsa et al., 2009).

1856

2) Les protéines non-structurales (NS)

- 1858 A- NS1
- 1859

NS1 est une glycoprotéine de 48 kDa (352 AA) dont le rôle n'est pas complètement compris. Cependant, il est décrit que la protéine existe sous différents états d'oligomérisation suivant l'état de glycolysation dans laquelle elle se trouve. Cette glycolysation pourrait être en partie explicable par l'interaction de cette protéine (et de NS4B) avec le complexe OST (*Oligo-Saccharyl-Transferase*) du RE permettant le transfert d'oligossaccharides au niveau des résidus asparagine de NS1 (Hafirassou et al., 2017).

1866 Dans le cytoplasme des cellules infectées, NS1 sous forme dimérique, favorise la 1867 fixation du complexe réplicatif du DENV aux membranes provenant du RE (Rastogi et al., 1868 2016). Elle est par ailleurs capable d'interagir avec différentes protéines cellulaires définies 1869 comme des facteurs cellulaires dont dépend la réplication virale. Parmi les nombreuses 1870 interactions décrites, l'interaction avec le complexe CCT, complexe permettant un repliement 1871 des protéines suivant un mécanisme dépendant de l'ATP et préalablement identifié pour sa 1872 participation au cycle réplicatif du virus dans d'autres modèles viraux, suggére un rôle de 1873 CCT dans le repliement de la polyprotéine du DENV (Hafirassou et al., 2017). L'interaction 1874 avec RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) et RPSP25 (Ribosomal Protein Spurs 1875 Faulty Translation), protéines associées au ribosome est nécessaire à la réplication virale 1876 possiblement pour permettre une traduction de l'ARN viral de façon coiffe-indépendante dans 1877 le cas où la tranduction d'ARNs coiffés serait inhibée (Hafirassou et al., 2017).

1878 Comme nous l'avons déjà évoqué, sécrétée sous forme hexamérique, NS1 permet d'inhiber la
1879 réaction du complément contre les virions du DENV (Avirutnan et al., 2007; Somnuke et al.,
1880 2011) et le taux de NS1 sécrété a été corrélé avec le développement d'une forme sévère
1881 (Watterson et al., 2016).

1882 Outre son rôle dans la réplication, elle est également impliquée dans la production de 1883 particules virales via des interactions avec les protéines structurales E et prM. Sa mutation 1884 perturbe l'assemblage des néo-virions (Scaturro et al., 2015).

Par ailleurs, une mauvaise séparation de la protéine NS1 avec la protéine suivante NS2A
affecte également la réplication virale (Xie et al., 2015).

1887 B- Les protéines NS2A, NS2B, NS4A et NS4B

1888 Pour les protéines hydrophobes NS2A (22 kDa, 218 AA), NS2B (15 kDa, 130 AA), NS4A (16 kDa, 127AA) et NS4B (27 kDa, 250AA) peu de données sont disponibles mais 1889 1890 plusieurs études ont démontré qu'elles seraient impliquées dans l'ancrage des protéines de 1891 réplication virale dans les membranes cellulaires. N'ayant pas d'activité enzymatique propre, 1892 leur action passerait par des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides (Gopala 1893 Reddy et al., 2018). NS2A permettrait d'organiser la réplication du DENV en coordonnant le 1894 recrutement de l'ARN viral néo-synthétisé depuis le complexe de réplication vers le site 1895 d'assemblage avec celui des protéines structurales des néo-virions et de la protéine NS3 1896 assurant le clivage du peptide C-prM ainsi que des protéases cellulaires pour cliver la liaison 1897 prM-E (Xie et al., 2019). NS4A aurait un rôle dans l'induction d'altérations des membranes 1898 du RE de la cellule hôte nécessaire à la mise en place de complexe de réplication. Les 1899 mécanismes restant à caractériser (Fernandez-Garcia et al., 2009).

1900 NS4B participe à l'inhibition de la réponse interféron induite par l'infection (réponses
1901 de type interféron α et β) (Dalrymple et al., 2015; Li et al., 2015).

1902 C- NS3

1903 Cette protéine est très conservée puisque 77% d'homologie dans la séquence des AA
1904 de la protéine ont été retrouvés entre les différents sérotypes de DENV (Li et al., 2005;
1905 Swarbrick et al., 2017)

NS3 est une protéine d'environ 620 AA de long et possède deux domaines, un
domaine protéase en N-terminal (167 AA) suivi d'un domaine hélicase (446 AA). La portion
centrale hydrophile permet la fixation du cofacteur de l'activité NS3 protéase, NS2B qui
stabilise la protéine. Elle possède quatre activités enzymatiques identifiées protéase, hélicase,
adénosine triphosphatase (ATPase) et ARN 5' triphosphatase (RTPase) (Luo et al., 2010; Luo
et al., 2008a; Luo et al., 2008b; Xu et al., 2005).

La région N terminale de NS3 présente, avec l'aide de son cofacteur NS2B, l'activité sérine protéase et est responsable du clivage de la polyprotéine (Falgout et al., 1991; Li et al., 1914 1999; Li et al., 2005; Yusof et al., 2000). Le domaine C terminal s'organise en trois sousdomaines portant l'activité hélicase permettant un déroulement de l'ARN double brin (Luo et al., 2008b; Singleton and Wigley, 2002), une activité ATPase sur les nucléotides assurant la mise en place d'une coiffe au niveau des brins d'ARNs nouvellement synthétisés ainsi qu'une activité RTPase (Benarroch et al., 2004; Yon et al., 2005). L'activité hélicase spécifique au
génome viral est assurée par la reconnaissance d'une région conservée au niveau de
l'extrémité N terminale des ARNs viraux (Swarbrick et al., 2017). Ce domaine interagit avec
le cofacteur NS4B (Li et al., 2015; Luo et al., 2008b).

Outre son implication dans la réplication virale par façonnement des vésicules de réplication du virus (Chua et al., 2004; Heaton et al., 2010), le clivage de la polyprotéine tout en amorçant la réplication de l'ARN viral (Lescar et al., 2008) et le détournement de l'énergie cellulaire (Silva et al., 2019), il a été également identifié que la protéine NS3 et plus précisément une région riche en proline du domaine protéase N terminal est cruciale pour la production de particules DENV infectieuses (Gebhard et al., 2016).

1928 D- NS5

1929 NS5 est la protéine la plus grosse (102 kDa pour 900 AA) et la plus conservée entre 1930 les différents sérotypes de DENV (El Sahili and Lescar, 2017; Lim et al., 2015). Elle possède 1931 deux domaines dotés d'activité enzymatique : le domaine méthyltransferase (MTase) au 1932 niveau de l'extrémité N-terminale et une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) au 1933 niveau de l'extrémité C-terminale. Les deux domaines sont connectés par une séquence de 1934 liaison de 5 ou 6 résidus, région importante pour la conformation protéique et son activité 1935 enzymatique. Le domaine MTase permet de coiffer les génomes viraux en cours de synthèse 1936 et aurait possiblement une activité de guanylyl transférase et de méthylation des 2'O ribose. 1937 Le domaine RdRp, lui, permet la polymérisation de l'ARN ainsi qu'un transfert de 1938 groupement méthyl sur l'ARN viral.

1939 NS5 est également connue pour permettre une suppression de la voie de l'interféron
1940 par fixation à STAT2 (Ashour et al., 2009) et en empêchant le recrutement du complexe de
1941 transcription PAF1C.

Elle se trouverait à proximité de NS3 en utilisant le simple brin d'ARN produit par la protéine NS3 hélicase comme substrat (Tay et al., 2015). Cette interaction retrouvée entre les différents flavivirus, favoriserait en outre l'activité triphosphatase de NS3 (Klema et al., 2015).

1946 NS5 se localise fortement au niveau du noyau des cellules infectées (Lopez-Denman and
1947 Mackenzie, 2017) où elle a été identifiée comme interagissant avec des protéines du

- 1948 spliceosome inhibant leur activité de façon indépendante de son activité enzymatique et
- 1949 permettant ainsi de créer un environnement plus favorable à la réplication virale (De Maio et
- 1950 al., 2016).



1952 <u>Figure 31 :</u> Cycle de vie des virus *flavivirus*, exemple du DENV (Traduit d'après (Uno 1953 and Ross, 2018)).

1954 1 : L'incorporation du DENV se fait par attachement puis par reconnaissance des protéines de 1955 surfaces de virions par des récepteurs exprimés à la surface de la cellule cible que nous détaillerons 1956 au paragraphe suivant. 2 : Grâce à la reconnaissance du virion par le récepteur une endocytose a 1957 lieu. 3 : La fusion avec la membrane endosomale libère le génome viral dans le cytoplasme. 4 : La 1958 polyprotéine est traduite par les ribosomes cellulaires exprimés au niveau du RER. 5 : Elle est clivée 1959 par des protéases cellulaires et virales. 6 : Les protéines virales et cellulaires participent au 1960 remodelage des membranes du RE afin de générer des sites de réplication (vesicles packets). 7 : Les 1961 particules virales s'assemblent au niveau du RE. 8 : Elles migrent ensuite vers l'appareil de Golgi. 8 :

104

Au sein de leur trajet dans le réseau trans-golgien (TGN), la furine assure la maturation des
particules virales par clivage de la protéine prM. 9 : Les particules sont alors sécrétées par exocytose
qu'elles aient achevé ou non leur maturation.

1965

1) L'internalisation du virus dans les cellules

1966

1967 Comme les autres *flavivirus*, l'entrée du DENV dans les cellules cibles se fait par un 1968 processus d'endocytose médiée par la reconnaissance du virus par un récepteur cellulaire 1969 exprimé au niveau de la membrane de la cellule cible (**figure 31, étape 1**).

1970 Le DENV, comme nous venons de le voir au paragraphe précédent, s'organise en particules 1971 virales enveloppées recouvertes par 90 dimères de glycoprotéines E organisées en icosaèdre 1972 enchâssées dans une membrane dont la composition lipidique est issue de la cellule 1973 productrice. Le domaine III de la protéine E est responsable de la fixation aux récepteurs du 1974 DENV (Chin et al., 2007; Hung et al., 2004). Néanmoins, la composition en cholestérol de la 1975 particule virale, et donc de la membrane où elle s'est formée, faciliterait l'attachement et 1976 l'internalisation de la particule virale dans la cellule cible (Acosta et al., 2012; Carro and 1977 Damonte, 2013; Suksanpaisan et al., 2009).

La reconnaissance et l'internalisation du DENV dans les cellules est un processus 1978 1979 nécessitant une première phase au cours de laquelle les virions vont interagir de manière 1980 aspécifique avec des facteurs d'attachement permettant de stabiliser et de rapprocher les virus 1981 de la surface de la cellule afin de permettre une seconde phase d'attachement spécifique 1982 permettant l'entrée du virus dans la cellule grâce à la formation d'un complexe virus-1983 récepteur (Cruz-Oliveira et al., 2015). Les récepteurs aux DENV sont multiples, en accord 1984 avec les capacités du virus à infecter à la fois des espèces très différentes (du moustique à 1985 l'homme) (Cruz-Oliveira et al., 2015) mais aussi des types cellulaires complètement 1986 différents au sein d'une espèce donnée. Le virus n'ayant donc pas besoin d'un récepteur 1987 spécifique, est capable in-vivo d'étendre l'infection à l'ensemble de l'organisme expliquant 1988 les diverses manifestations cliniques observées chez les patients infectés. Toutefois certains 1989 récepteurs peuvent être capables de reconnaitre soit l'ensemble des sérotypes DENV ou bien 1990 être spécifiques d'un sérotype. Il a été montré dans des cellules de foie, que le DENV-1 1991 utilisait une reconnaissance par des laminines (Thepparit and Smith, 2004) alors que le 1992 DENV-2 utiliserait le récepteur GRP78 (Jindadamrongwech et al., 2004; Upanan et al., 2008). 1993 Ils permettent ainsi au DENV de pénétrer spécifiquement dans différents types cellulaires 1994 suivant les récepteurs exprimés.

Dans ce manuscrit nous nous concentrerons sur la description des récepteurs rencontrés à la
surface des cellules de mammifères (figure 32).

1997 Les premiers facteurs d'attachement aux particules de DENV sont exprimés à la 1998 surface de la plupart des cellules. Ce sont des carbohydrates dont les GAGs, tel que 1999 l'héparane sulfate (Chen et al., 1997), ou des glycosphingolipides neutres (GSL) dont le 2000 neolactotetraosylceramide. Leurs carbohydrates chargés négativement créent des attractions 2001 électrostatiques avec les glycoprotéines E des virions (Reyes-Del Valle, 2014). Une fois 2002 attachées à la surface cellulaire, les particules infectieuses vont alors être reconnues par des 2003 récepteurs plus spécifiques localisés dans des zones enrichies en clathrine (van der Schaar et 2004 al., 2008) : les lectines dont la molécule DC-SIGN (Adhesion molecule-3-grabbing non-2005 integrin) exprimée à la surface de cellules dendritiques ou son homologue des cellules 2006 endothéliales L-SIGN (Navarro-Sanchez et al., 2003; Varga et al., 2014). Le récepteur au 2007 mannose a également été identifié comme un récepteur possible du DENV dans les 2008 macrophages (Miller et al., 2008). La reconnaissance des récepteurs DC-SIGN (Mondotte et 2009 al., 2007) et au mannose (Pokidysheva et al., 2006) a lieu par l'intermédiaire d'un domaine de 2010 reconnaissance des carbohydrates (CRD) présent sur la protéine E au niveau de son résidu 2011 asparagine 67. Néanmoins, l'internalisation médiée par DC-SIGN ne semble pas être le seul 2012 mécanisme impliqué (Lozach et al., 2005).

2013 Pour l'adsorption du virus, des protéines chaperonnes normalement exprimées dans les 2014 cytoplasmes cellulaires peuvent se retrouver exprimées à la surface des cellules : HSP-90, 2015 HSP-70 (Heat Shock protein) (Reves-Del Valle et al., 2005) et GRP-78 (glucose-regulated 2016 protein, protéine chaperonne associées au RE) (Jindadamrongwech et al., 2004; Upanan et al., 2017 2008). Même si la façon dont ces protéines sont relocalisées à la surface ou si leur 2018 fonctionnement à l'extérieur des cellules sont à ce jour inconnus, dans les cellules hépatiques monocytiques et neurales, ces protéines ont été montrées pour participer à la reconnaissance 2019 2020 de la glycoprotéine E exprimée à la surface des virions de DENV (Jindadamrongwech et al., 2021 2004; Upanan et al., 2008).

D'autres protéines comme le récepteur de haute affinité aux laminines, reconnaissant notamment le DENV-1 dans les cellules hépatiques (Thepparit and Smith, 2004), le récepteur aux lipopolysaccharides CD14 retrouvé en cellules dendritiques (Chen et al., 1999), la claudine-1 constituant majeur des jonctions serrées et surexprimée lors des stades précoces de l'infection DENV, jouent le rôle de cofacteur d'entrée notamment pour les particules 2027 immatures ou partiellement matures par reconnaissance de la protéine prM (Che et al., 2013;2028 Gao et al., 2010).

2029 De la même façon, dans les cellules endothéliales, les lymphocytes et les plaquettes sanguines, la protéine isomérase disulfite (PDI) joue un rôle important dans l'entrée de 2030 2031 nombreux virus dont le DENV. Enfin, les récepteurs transmembranaires reconnaissant les 2032 résidus phosphatidylsérine et assurant l'élimination des cellules apoptotiques : TIM-1 (T-cell 2033 immunogmobulin domain and mucin domain) et TAM (Tyro3, Axl, and Mer) sont impliqués 2034 dans l'infection au DENV. Ces récepteurs, reconnaissant les résidus phosphtidylsérine 2035 associés aux virions, facilitent ainsi la pénétration de ces derniers dans les cellules (Meertens 2036 et al., 2012). Les molécules de phosphatidylsérine étant impliquées dans l'apoptose cellulaire, 2037 le DENV détournerait donc la voie apoptotique pour pénétrer au sein des cellules (Meertens et 2038 al., 2012; Perera-Lecoin et al., 2013). Plus récemment, il a été identifié que l'ubiquitination de 2039 TIM-1 au niveau de résidus lysine de son domaine cytoplasmique est nécessaire à l'induction 2040 de l'endocytose suite à la fixation de virions DENV (Dejarnac et al., 2018). CD300a, autre 2041 récepteur aux phospholipides est également capable de favoriser l'infection par le DENV en 2042 reconnaissant principalement les résidus phosphatidyléthanolamine et en moindre mesure les 2043 résidus phosphatidylsérine associés aux particules virales (Carnec et al., 2016).



2044 <u>Figure 32 :</u> Les différents récepteurs au DENV (Traduit de (Cruz-Oliveira et al., 2015)).

2045 Les virions matures roulent à la surface des cellules et sont reconnus par les GAGs favorisant leur

2046 attachement. Une fois attachés, ces virions peuvent êre internalisés par différents récepteurs : le

2047 récepteur au mannose, DC-SIGN, HSP70/HSP90, TIM/TAM. Lors d'une seconde infection avec un

2048 sérotype différent du premier, les virions matures mais aussi immatures peuvent être reconnus par des

2049 anticorps qui faciliteront l'infection (ADE) des cellules suite à leur reconnaissance par le récepteur

2050 *FC*ү.
2051 Un autre récepteur au DENV, un peu particulier et propre aux cellules immunitaires 2052 (monocytes et macrophages), est le récepteur Fcy (Chan et al., 2019; Halstead and O'Rourke, 2053 1977). Son implication est liée à l'effet ADE précédemment décrit. Ce récepteur reconnaît la 2054 partie constante d'anticorps liés à un agent pathogène ou à une cellule infectée et facilite la 2055 phagocytose des complexes anticorps-agent pathogène formés ou l'élimination des cellules 2056 infectées par cytotoxicité. Ce récepteur ne peut donc être utilisé par le DENV comme voie 2057 d'entrée dans les cellules lors d'une primo-infection puisque l'organisme n'aura pas encore 2058 été en contact avec le virus et n'aura donc pas généré d'anticorps spécifiques au DENV. En 2059 revanche, lors d'une seconde infection comme expliqué précédemment, les anticorps produits 2060 lors de la primo-infection vont pourvoir être utilisés par le virus pour pouvoir pénétrer plus 2061 facilement dans les cellules d'où le nom d'anticorps facilitant (Guzman et al., 2013; Halstead 2062 et al., 1973; Peiris and Porterfield, 1979).

2063

2064 Les lipides présents dans la membrane de la cellule cible du virus jouent également un 2065 rôle important dans l'entrée virale. Au sein de la membrane plasmique, la constitution des 2066 micro-domaines enrichis en cholestérol et en sphingolipides appelés des radeaux lipidiques 2067 participe à la concentration des récepteurs aux virus facilitant ainsi l'internalisation virale. 2068 Dans le cas des hépatocytes, le cholestérol joue un rôle majeur dans l'entrée mais aussi dans 2069 les étapes ultérieures de réplication du DENV. Ensuite, d'autres lipides sont importants et 2070 nécessaires à la fusion et la libération du DENV dans le cytoplasme cellulaire : on parle de 2071 co-facteurs lipidiques. Parmi eux, nous avons les lipides anioniques de la phosphatidylsérine 2072 (PS) et du bis(monoacylglycero)phosphate, acquis au cours de l'acidification de l'endosome, 2073 dont l'interaction avec les protéines E virales change leurs conformations en une 2074 conformation permettant la fusion avec la membrane endosomale (Zaitseva et al., 2010).

2075

2076 Suite à la reconnaissance du virion par le complexe-récepteur, l'internalisation à 2077 proprement parlé de la particule virale dans les cellules cibles commence. Elle se fait par un 2078 mécanisme d'endocytose classique médiée par la clathrine (Acosta et al., 2009; van der 2079 Schaar et al., 2008). L'acidification du contenu de l'endosome ainsi que la fusion des 2080 membranes endosomales permet à la nucléocapside de se retrouver dans le cytoplasme de la 2081 cellule nouvellement infectée avant d'y libérer le génome viral (figure 31, étapes 2 et 3). Ce 2082 dernier est alors accessible et reconnu tel un ARNm cellulaire par les ribosomes de la cellule 2083 hôte et est traduit en une polyprotéine unique. Sa séquence contient des signaux peptidase qui 2084 seront reconnus par les protéases cellulaires et virales permettant ainsi son clivage en
2085 protéines structurales et NS.

Une endocytose médiée par la cavéoline a également été identifiée dans des cas d'infection au DENV-1 de cellules Véro. Il semblerait que cette endocytose soit dépendante du sérotype infectieux car le DENV-2 infecte ces mêmes cellules par voie classique d'endocytose dépendante de la clathrine (Acosta et al., 2009). Il existe également des différences entre les génotypes : la souche 16681 du DENV2 utilise la voie de l'endosome tardif dépendant de Rab7 alors que la souche NGC utilise les endosomes de recyclage indépendant de Rab7 pour pouvoir être libérée dans le cytoplasme (Acosta et al., 2012).

2093

2) La réplication du DENV dans les cellules

2094

Le DENV, comme tous les *Flaviviridae*, a la particularité de se répliquer dans le cytosol des cellules infectées. Les protéines NS s'associent au RE afin d'organiser des complexes réplicatifs (**figure 31, étape 6**) permettant la synthèse de brins d'ARN négatifs grâce à l'ARN-polymérase virale dépendante de l'ARN, NS5. Ces brins seront ensuite utilisés comme modèles pour la synthèse de nouveaux brins de polarité positive qui pourront alors de nouveau rentrer dans un cycle réplicatif de production de nouveaux génomes viraux (El Sahili and Lescar, 2017).

2102 Outre leur rôle dans la réplication de l'ARN du virus, les protéines virales participent 2103 également au remodelage de la membrane du RE en modifiant notamment sa courbure mais 2104 aussi sa composition en lipides afin de promouvoir la formation de l'enveloppe des virions 2105 nouvellement synthétisés. En effet, simultanément, de nouveaux virions sont peu à peu 2106 formés au niveau du RE par encapsidation des brins d'ARNs à polarité positive néo-2107 synthétisés dans une capside et une enveloppe lipidique provenant de la membrane du RE et 2108 enchâssant les protéines immatures pré-membranaire et d'enveloppe (Pong et al., 2011; 2109 Zhang et al., 2003a).

L'ARN simple brin viral à polarité positive, libéré dans le cytoplasme des cellules, permet au virus d'être directement pris en charge par les ribosomes du RER cellulaire. Le génome sera ainsi traduit en une polyprotéine qui sera co- et post-traductionnellement clivée en trois protéines structurales (enveloppe (E), pré-membrane (prM) et de capside (C)) ainsi que de sept protéines NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (Bartenschlager and Miller, 2008). 2116 Cette polyprotéine va être clivée par les protéases cellulaires et virales et les différentes protéines formées vont alors s'organiser en un complexe de réplication au niveau 2117 2118 du RE de la cellule (figure 31, étape 5). Les protéines du DENV vont induire des replis de la 2119 membrane du RE (Welsch et al., 2009) afin de créer un véritable réseau dans lequel 2120 s'organise un couplage entre la formation de nouvelles enveloppes pour les virions et la 2121 synthèse de l'ARN viral (Miller and Krijnse-Locker, 2008). Les protéines C et NS2a, NS2b, 2122 NS4a et NS4b se trouvent ancrées dans la membrane du RE. Les protéines structurales prM et 2123 E subiront des glycosylations par maturation dans la lumière du RE puis au travers le TGN. 2124 Ces glycosylations permettront l'association hétérodimèrique des protéines prM et E qui 2125 seront utilisées pour constituer l'enveloppe des virions. Les protéines NS3 et NS5 sont 2126 cytosoliques et seront recrutées dans les vésicules de réplications.

2127 Les altérations des membranes intracellulaires du RE induites par le DENV sont 2128 décrites la plupart du temps sous le nom de « membranous web » ou réseau membranaire. 2129 Deux types d'altérations sont retrouvées : des circonvolutions membranaires (convoluted 2130 *membranes*) qui sont le lieu de traduction de l'ARN viral en polyprotéine et de la maturation 2131 de cette dernière, et des « paquets de vésicules » (vesicle packets, VPs) constituant le site de 2132 la réplication du virus. L'ARN viral y est répliqué grâce à l'ARN polymérase virale 2133 dépendant de l'ARN : NS5. La synthèse du brin d'ARN se fait par complémentarité avec le 2134 brin positif générant des brins d'ARN de polarité négative (figure 33).

Les circonvolutions membranaires seraient une zone de stockage des protéines et des lipides
utiles à la réplication virale et qui seraient mobilisées aux besoins du virus (Welsch et al.,
2009).

2138

Les VPs sont connectées au cytoplasme cellulaire via un pore qui permettra le recrutement des protéines NS3 et NS5 d'une part mais également la sortie du brin d'ARN néo-synthétisé pour permettre son encapsidation par association avec les protéines C selon les mécanismes préalablement décrits plus haut lors de la présentation de la protéine capside (**figure 33**).

Cette nucléocapside est ensuite enveloppée dans une bicouche lipidique dérivant d'un bourgeonnement au travers de la membrane du RE de la cellule hôte dans laquelle seront enchassées les protéines d'enveloppe et pré-membranaires néo-synthétisées. Cette enveloppe contient majoritairement de la phosphatidylcholine, les lipides représentant environ 20% des nouveaux virions formés.



2149 **Figure 33 :** Schéma de la réplication DENV (d'après (Welsch et al., 2009)).

2150 Suite à la libération dans le cytoplasme, le génome viral est traduit au niveau du RER par les 2151 ribosomes en une polyprotéine à l'origine de protéines structurales et NS après clivage par la 2152 protéase virale NS3 et des protéases cellulaires. NS4A, ainsi que d'autres protéines virales, génèrent, 2153 avec l'aide de protéines cellulaires, des modifications de la membrane du RE, dont des 2154 circonvolutions membranaires (CMs) et des paquets de vésicules (VPs) où a lieu la réplication. Ils 2155 sont connectés entre eux et au cytoplasme par des pores. Les néo-génomes viraux synthétisés sont 2156 ensuite grâce à ce même pore exportés et s'associent alors avec des protéines de capside pour générer 2157 de nouveaux virions. Ces virions sont ensuite accumulés au niveau des citernes du RE, dans les « sacs 2158 à virus », avant d'être individuellement addressés à l'appareil de Golgi où a lieu la maturation.

2159

Les nouveaux virions formés seront ensuite emmenés dans des sites distants de la lumière du RE et s'accumulent au niveau du compartiment de citerne mitochondriale dans des « sacs à virus » (**figure 33**) (Scaturro et al., 2015). Ils seront ensuite adressés individuellement à l'appareil de Golgi (**figure 31, étape 7**). 2164

3) La maturation des virions et leur sécrétion

2165

2166 Une fois produites, les particules virales ne sont pas encore matures et incapables 2167 d'infecter de nouvelles cellules cibles. Elles se présentent sous forme de particules dont la 2168 surface comporte 180 copies de chaque protéine E et prM qui, comme expliqué 2169 précédemment lors de la présentation des fonctions des protéines du DENV, s'associent sous 2170 formes trimériques. Les virions présentent alors une surface rugueuse présentant 60 spicules. 2171 Elles vont donc être adressés à l'appareil de Golgi où elles subiront des maturations au cours 2172 de leur trajet au sein du TGN. La composition acide du TGN est responsable de la maturation 2173 par réarrangement des protéines de surface : elles s'associent alors en dimères et 90 spicules 2174 de tailles plus petites sont présentes à la surface de la particule virale qui passe alors d'un 2175 aspect rugueux à lisse (Figure 34).



2176 <u>Figure 34 :</u> Evolution de la structure des virions DENV (Illustrations de 2177 cryomicroscopie électronique issues de (Kostyuchenko et al., 2013)).

2178 Les deux particules présentent une forme globalement icosahédrique comme présenté au paragraphe

2179 V) mais la particule immature (gauche) présente à sa surface 60 spicules résultats d'une association

2180 de protéines E et prM alors que la particule mature (droite), est plus lisse, et associe par dimère 90

2181 protéines E organisées en épi de blé et des protéines M matures.

2182

La maturation des virions s'opère au niveau des protéines de membranes : une protéase à sérine cellulaire, la furine, clive la protéine pré-membranaire prM en la protéine M et le fragment pr (Li et al., 2008; Shapiro et al., 1997; Zhang et al., 2003b). Comme expliqué préalablement, la composition acide du TGN retient la protéine pr empêchant la fusion de la protéine E avec les membranes cellulaires. Ce n'est qu'une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, où le pH est neutre, que la protéine pr des néo-virions est relâchée et achève la maturation de la particule virale (Yu et al., 2009) (figure 35).



2190 <u>Figure 35 :</u> Evolution des protéines de surface du DENV (Illustrations issus de (Perera
2191 and Kuhn, 2008)).

2192 Les particules immatures générées à partir du RE (Réticulum Endoplasmique) présentent une surface

2193 rugueuse liée à la présence de spicules résultant de l'association des trimères de protéines prM:E. Les

2194 virions maturent au sein de leur trajet dans le TGN (réseau trans-golgien), le pH acide du Golgi

2195 modifie l'association des protéines de surface, rendant alors le site de clivage accessible par la furine.

2196 Celle-ci coupe la protéine prM en pr et M. La protéine pr reste associée aux protéines M et E

2197 *jusqu'au milieu extracellulaire où le retour à un pH neutre entraine la libération de la protéine pr.*

2198

Les particules virales matures seront alors sécrétées par exocytose ou lyse de la cellule hôte. Il arrive parfois que le cycle de maturation de la particule soit non réalisé ou incomplet aboutissant à la sécrétion de particules immatures ou partielles matures (**figure 31, étape 9**). Bien que ces particules soient non-infectieuses à proprement parler, elles sont immunogènes et donc capables de favoriser la mise en place d'un phénomène ADE (Wirawan et al., 2019).

Chapitre 4 : Rationnel et Objectifs de l'étude

- 2205

I. Présentation des modèles cellulaires d'étude

2206

2207 Comme nous l'avons expliqué dans la troisième partie de cette introduction, le 2208 tropisme du DENV est large et il peut infecter efficacement un grand nombre de types 2209 cellulaires dont les hépatocytes. Les études cliniques des patients atteints de dengue sévère 2210 ainsi que des autopsies de personnes décédées suite au développement d'une forme de dengue 2211 hémorragique, montrent que chez ces patients, l'atteinte hépatique est importante avec une 2212 accumulation massive de gouttelettes lipidiques intra-hepatocytaires ou stéatose hépatique 2213 suggérant un impact important de l'infection sur le métabolisme lipidique hépatique. D'autre 2214 part, plusieurs facteurs de comorbidité comme la NAFLD (Non-alcoholic Fatty Liver 2215 Disease) ont été identifiés soulignant le lien entre état métabolique du foie, son infection et 2216 pronostic clinique. L'ensemble de ces observations nous interroge donc sur l'infection du 2217 tissu hépatique et la réplication dans ce tissu.

2218

2219 Notre projet de recherche est donc orienté vers l'analyse de la réplication du DENV 2220 dans des cellules hépatocytaires. Nous avons choisi de travailler avec différents modèles de 2221 lignées d'hépatocytes, afin de pouvoir maitriser les paramètres phénotypiques des cellules 2222 cultivées. L'utilisation de cellules primaires présenterait l'avantage de permettre des 2223 observations au plus près de ce qui est in-vivo, mais avec d'importantes contraintes 2224 financières et techniques pour l'obtention en quantité de cellules issues de foies sains pour 2225 pouvoir réaliser des infections. Nous avons donc choisi une lignée couramment utilisée pour 2226 des études d'infection virale et plus particulièrement d'infection par la dengue : les cellules 2227 HuH7 (Human Hepato-cellular carcinoma 7). Ces cellules ont été isolées en 1982 à partir 2228 d'une tumeur cancéreuse hépatique d'un patient japonais de sexe masculin âgé de 57 ans. La 2229 lignée obtenue a été caractérisée par Nakabayshi H. et Sato J. (Nakabayashi et al., 1982), et 2230 est d'origine épithéliale. La majorité des cellules HuH7 présentent un nombre de 2231 chromosomes compris entre 55 et 63 (nombre modal de chromosomes 60) et sont assez 2232 hétérogènes (Kasai et al., 2018). Ces cellules sont adhérentes et se développent généralement 2233 sous forme de monocouches 2D. Bien qu'elles contiennent de nombreuses mutations et 2234 insertions ou délétions, il est à noter une mutation ponctuelle dans le gène p53. L'un des inconvénients majeurs rencontré lors de l'étude du métabolisme des cellules cancéreuses est 2235

leur métabolisme hautement glycolytique orienté vers le catabolisme avec une
phosphorylation oxydative très faible. Ces caractéristiques sont éloignées des caractéristiques
de cellules différenciées mais sont retrouvées dans toutes les cellules en phase de
multiplication importante comme le sont les lignées cellulaires cultivées en laboratoire.

2240 L'hépatocyte différencié a la capacité de sécréter des lipoprotéines de très faible 2241 densité pour redistribuer dans l'organisme les lipides qu'il synthétise et de stocker le glucose 2242 sous forme de glycogène en réponse à l'insuline. Cette particularité métabolique est en partie 2243 supportée par l'expression d'HK4 (GCK) qui permet avec l'action coordonnée du pancréas de 2244 contrôler une part importante de l'homéostasie glucidique sanguine. Comme, nous l'avons 2245 également évoqué dans le paragraphe sur les HKs cellulaires, la forme d'HK exprimée dans 2246 les cellules dépend de leur état (pathologique ou physiologique). Ainsi, dans toutes les lignées 2247 cancéreuses hépatiques comme les HuH7, l'isoenzyme 4 qui est normalement exprimé dans 2248 les cellules de foie est remplacé par l'HK2. L'expression de cet isoenzyme HK2 est décrite 2249 comme un élément central de la glycolyse aérobie des cellules en prolifération.

L'équipe s'intéressait à l'interférence des virus avec le métabolisme central du carbone lorsqu'elle a identifié les HKs comme une cible des virus. A alors été entrepris de générer un modèle se rapprochant un peu plus d'un modèle d'hépatocytes physiologiques (bien qu'il reste un modèle d'hépatocyte cancéreux). En partant des cellules HuH7, l'équipe a créé un modèle cellulaire dans lequel a été supprimé le gène codant la forme 2 d'HK par CRISPR/Cas9 afin de le remplacer par la forme 4, physiologique, par transduction lentivirale permettant l'obtention d'une lignée stable (**Figure 36**).



2257 Figure 36 : Schéma explicatif de l'obtention de la lignée HuH7 HK4+ HK2-.

2258

Les caractérisations métabolique et transcriptomique de ces deux types cellulaires, ont été réalisées et nous indiquent que le simple changement d'HK entre ces deux cellules modifie considérablement leur aspect et leur métabolisme. L'expression d'HK4 conduit à un 2262 changement du volume cellulaire et leur contenu en glycogène et en lipides est fortement 2263 augmenté avec une lipogenèse restaurée. Les cellules retrouvent également la capacité de 2264 synthétiser des lipoprotéines de très faible densité (VLDL-like) en comparaison des 2265 lipoprotéines LDL-like sécrétées par les HuH7. La réorganisation du TCA suite au 2266 remplacement de l'HK2 par l'HK4 est associée à un potentiel énergétique supérieur. En effet, 2267 malgré un ratio ATP/ADP identique entre les cellules exprimant HK2 ou HK4, les cellules 2268 exprimant HK4 ont un contenu global en ATP et ADP supérieur. Enfin, des modifications 2269 importantes dans leurs capacités à activer les cellules NK ont également été observées.

Nous avons donc profité de la disponibilité dans le laboratoire de cette lignée possédant
des caractéristiques particulièrement intéressantes dans le contexte du métabolisme lipidique
hépatique pour étudier la réplication du DENV dans ce modèle.

II. Interactome des protéines DENV et des enzymes humaines du CCM

2275

2276 Comme nous l'avons vu en première partie de cet exposé, il est maintenant clairement 2277 établi que les virus utilisent et réorientent le métabolisme de la cellule hôte pour se répliquer. 2278 En revanche, même si une littérature de plus en plus abondante existe sur l'analyse des 2279 modifications métaboliques induites par l'infection virale, peu d'études ont caractérisé 2280 précisément les mécanismes moléculaires et les facteurs impliqués dans l'interaction 2281 virus/cellules.

2282 Spécifiquement pour le DENV, beaucoup de données existent sur l'interférence du 2283 virus avec les voies de signalisation de l'immunité par exemple, mais seulement quelques 2284 travaux ont exploré la relation qui existe entre réplication de ce virus et métabolisme 2285 cellulaire. A l'heure actuelle, des efforts sont faits dans ce domaine puisque la littérature 2286 dispose de plusieurs études portant sur l'identification et la caractérisation de ces interactions. 2287 Karyala et son équipe ont développé en 2016, une plateforme de données en ligne gratuite 2288 d'accès appelée DenHunt (http://proline.biochem.iisc.ernet.in/DenHunt/index.php) basée sur 2289 une énumération la plus exhaustive possible des interactions entre les protéines virales du 2290 DENV et les protéines humaines. Leur analyse et la construction de leur base de données ont 2291 été réalisées manuellement à partir de lectures d'articles de la littérature scientifique ayant 2292 décrit des interactions entre des protéines du DENV et des protéines humaines ; sont incluses 2293 et considérées comme interactions, aussi bien les interactions physiques (directe ou indirecte) 2294 que fonctionnelles (expression différentielle entre cellules infectées ou non). Ainsi, lors de sa création 682 interactions directes, 382 interactions indirectes et 4120 gènes différentiellement
exprimés entre des cellules infectées et non infectées ont été identifiés (Karyala et al., 2016).
Cette étude a identifié que 7% des protéines humaines interagissant avec des protéines du
DENV semblent être impliquées dans d'autres pathologies comme des infections
bactériennes, d'autres infections virales ou encore des cancers et des pathologies autoimmunes soulignant ainsi l'intérêt de ce type d'étude pour l'identification de nouvelles cibles
thérapeutiques.

2302

Les données d'interactomes disponibles nous indiquent que les protéines humaines avec lesquelles les protéines du DENV interagissent sont majoritairement impliquées dans des processus de transduction du signal, dans l'immunité, le transport et le catabolisme de molécules et le métabolisme cellulaire.

2307 Notre étude s'est fondée sur une analyse antérieure de notre équipe des interactions 2308 physiques entre protéines pan-virales et protéines humaines (de Chassey et al., 2012; 2309 Meyniel-Schicklin et al., 2012; Neveu et al., 2012; Tafforeau et al., 2012). L'identification du 2310 métabolisme du glucose comme cible d'HCV (Ramiere et al., 2014) et l'identification d'une 2311 interaction entre la protéine NS3 du DENV et les HKs nous a ainsi conduits à proposer ce 2312 projet d'études plus spécifique du DENV, pour déchiffrer les mécanismes moléculaires de 2313 modulation du métabolisme par ce virus. L'objectif est d'identifier des facteurs cellulaires 2314 nécessaires à la réplication virale et à plus long terme soit de poser les jalons d'un ciblage 2315 spécifique ou de caractériser des outils moléculaires d'origine virale qui seraient capables de 2316 moduler le métabolisme cellulaire.

2317 Par ailleurs l'identification de voies de signalisation communément impactées par l'infection 2318 DENV et d'autres pathologies peut être un atout pour l'identification de nouvelles stratégies 2319 thérapeutiques. En effet, le ciblage de fonctions cellulaires plutôt que l'utilisation d'antiviraux 2320 directs offre une barrière génétique plus forte et permet d'éviter l'apparition de variants 2321 viraux résistants. Par ailleurs, l'identification de molécules déjà indiquées dans le traitement 2322 d'autres pathologies et dont les protéines humaines et voies impliquées sont les mêmes que 2323 lors d'une infection DENV, permettrait de proposer leur repositionnement pour le traitement 2324 de la pathologie et ainsi diminuer les coûts et temps de recherche d'un nouvel agent antiviral.

2325

III. Objectifs de l'étude

2326

2327 Au début de cette étude, les données disponibles concernant l'infection de 2328 l'hépatocyte par le DENV et l'impact sur son métabolisme étaient peu nombreuses et 2329 suggéraient un rôle important du métabolisme lipidique dans la réplication du virus. Peu de 2330 mécanismes étaient décrits si ce n'est l'identification d'une interaction entre NS3 et la FAS 2331 responsable de sa relocalisation au site de réplication du virus et de NS3 avec la GAPDH 2332 également responsable du même type de relocalisation mais induisant une inactivation de 2333 l'enzyme. Nous disposions au laboratoire des outils cellulaires nécessaires à l'étude du 2334 métabolisme glucidolipidique dans l'hépatocyte et nous avons donc choisi de mener une 2335 étude comparative de l'infection par le DENV et de ses effets entre les cellules HuH7 et 2336 HuH7 HK4+ HK2- et inversement. Dans ce contexte, nous avons également recherché quel 2337 était le rôle de NS3 dans la modification de la glycolyse cellulaire. Pour cela deux modèles 2338 viraux, dérivant de la souche 16681 de DENV de sérotype 2, ont été utilisés pour réaliser 2339 l'ensemble des expériences : un modèle de réplicon de génome entier du virus couplé au 2340 rapporteur eGFP ainsi qu'un modèle de réplicon subgénomique (rSg) contenant le génome 2341 codant uniquement les protéines NS associées à un rapporteur à activité rénilla luciférase 2342 (rLuc).

Matériels et méthodes

I. Culture cellulaire

2344 2345

1) Culture des cellules

2346 Les lignées hépatocytaires HuH7 et leurs dérivés et dont les différents génotypes sont détaillés au paragraphe suivant, sont cultivées en routine en milieux DMEM (Dulbecco's 2347 Modified Eagle Medium, GibcoTM, référence A14430-01) supplémentés extemporanément 2348 avec 10% sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil, GibcoTM, référence 2349 10270-106), 5mM ou 25mM de glucose (+D glucose (200g/L), GibcoTM, référence A24940-2350 01), 1% pénicilline/ streptomycine (Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), GibcoTM, 2351 référence 15140-122), 1% HEPES (GibcoTM, référence 15630-056), 1% pyruvate (GibcoTM, 2352 référence 11360-039), 1% acides aminés non essentiels (GibcoTM, référence 11140-035) et 2353 4mM glutamine (L-Glutamine (200mM), GibcoTM, référence 25030-024). 2354

2355

2356 D'autres modèles cellulaires ont également été utilisés dans cette étude :

- Des cellules BHK-21 (« Baby Hamster Kidney », données gracieusement par le
 laboratoire des Infections Virales et Pathologies Comparées, Université Claude
 Bernard Lyon 1) afin de produire les particules virales pour réaliser les infections en
 laboratoire L3.
- Des cellules Véro (Cellules épithéliales de reins de singe vert d'Afrique) utilisées pour
 réaliser la seconde phase de production des particules infectieuses ainsi que les titres
 infectieux obtenus lors des différentes expériences.
- Des cellules HEK-293T (« Human Embryonic Kidney ») pour l'analyse des
 interactions entre les protéines virales et cellulaires de cette étude.

Ces trois types cellulaires ont été cultivés dans des milieux DMEM-glutaMAXTM (Dulbecco's
Modified Eagle Medium, GibcoTM, référence 61965-026) supplémentés avec 10% sérum de
veau fœtal (Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil, GibcoTM, référence 10270-106) et 1%
pénicilline/ streptomycine (Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), GibcoTM, référence
15140-122).

2371

Toutes les cellules sont maintenues dans des incubateurs à 5% CO2 avec une pression
saturante en eau à une température de +37°C.

2374 Les cultures ont été entretenues régulièrement par trypsination deux fois par semaine (0.05% Tryspine EDTA 1X, GibcoTM, référence 25300-054) après lavage en DPBS 1X 2375 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X, référence 14190-094). Les cellules ont été 2376 numérées à l'aide d'un compteur automatique de cellules (LUNA-IITM Automated Cell 2377 Counter, Logos Biosystems). La mortalité dans la culture cellulaire est évaluée 2378 2379 systématiquement à chaque passage par exclusion au bleu trypan (Trypan Blue, Sigma-Aldrich, référence T6146) et est inférieure à 2%. Elles sont ensemencées à raison de 2 ou 1,5 2380 millions de cellules par flaques de 150 cm^2 à chaque passage. 2381

2382

2) Création du modèle cellulaire HuH7 HK4+ HK2-

2383

2) Creation du modele central e fruit/ frK4+ frK2-

2384 Deux modèles cellulaires de lignées hépatocytaires sont principalement utilisés dans 2385 cette étude : des HuH7 (données gracieusement par le docteur Marco Blinder, Heidelberg), 2386 cellules issues d'un hépatocarcinome humain et des HuH7 HK4+ HK2-. Ces dernières ont été 2387 créées à partir d'HuH7 par Clémence Jacquemin, technicienne au sein du laboratoire du 2388 Docteur Vincent Lotteau. Dans ce modèle, l'expression d'HK2 a été invalidée par le système 2389 CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat - CRIPSR 2390 associated 9 protein) puis remplacée par HK4 aussi appelée GCK par transduction lentivirale. 2391 D'autres lignées hépatocytaires exprimant toujours HK2 et surexprimant des quantités croissantes d'HK4 (transduction lentivirale à différentes MOI) ainsi qu'une lignée 2392 2393 surexprimant HK2 ont également été générées.

2394 La transduction des cellules pour l'expression d'HK2 ou HK4 a été réalisée à partir de 2395 lentivirus produits au laboratoire. Les lentivirus ont été obtenus à partir de cellules HEK293T 2396 transfectées avec les plasmides contenant les inserts d'intérêt pLEX307-HK4 ou pLEX307-2397 HK2, plasmides psAX2 et pCMV-VSV-G. 6 heures post-transfection les cellules ont été 2398 lavées au DPBS et cultivées en milieu Optimem, Hépès 20 mM et 1%P/S pendant 36 à 40 2399 heures. Les surnageants de ces cultures ont ensuite été récoltés, centrifugés à 2 000 rpm 2400 pendant 10 minutes et filtrés à 0,45µm. Ils ont ensuite été ultrafiltrés sur Vivaspin 20 2401 (Sartorius, référence VS2042) à 4 000 rpm à +4°C pendant 20 minutes puis aliquotés et 2402 stockés à -80°C.

La MOI de transduction des cellules pour l'expression des protéines HK2 ou HK4 a été calculée à partir de la quantification de la protéine P24 des particules lentivirales produites. Cette titration de P24 a été obtenue avec un automate d'immuno-analyse (VIDAS® HIV P24 II, Biomérieux, référence 30117). Les résultats de ce dosage permettent de 2407 déterminer un titre exprimé en particules physiques par μ L (PP/ μ L) à partir de l'équivalence : 2408 1 ng de P24 équivaut à 12 x 10⁶ PP/ μ L. Les cellules transduites ont été sélectionnées par 2409 1 μ g/mL de puromycine ajouté au le milieu de culture pendant 10 jours.

2410

3) Traitement des cellules

2411

Afin d'évaluer l'impact de certains métabolites ou de voies de signalisation pour la réplication du DENV, les cellules, en particulier celles électroporées (voir le paragraphe « Electroporation des ARN » pour les détails concernant l'électroporation), ont été traitées avec différentes molécules dont notamment de l'acide oléique (Oleic acid, Sigma-Aldrich, référence O1383), du palmitate (Sodium palmitate, Sigma-Aldrich, référence P9767) ou encore du galactose (D-(+)-Galactose, Sigma-Aldrich, référence G5388).

Pour ce qui est des acides gras (acides oléique et palmitique), les molécules ont été ajoutées 4 heures post-électroporation au moment du changement de milieu à la concentration finale de 2420 250μ M pour l'acide oléique et de 100μ M pour l'acide palmitique. Les stocks d'acide oléique et palmitate ont été préparés à 10mM et stockés à -20° C dans l'éthanol. Ils sont ensuite dilués directement au moment de l'utilisation dans du milieu de culture chauffé préalablement à $+37^{\circ}$ C.

2424

2425 Le galactose est dilué à 25mM final dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoTM, référence A14430-01) supplémentés extemporanément avec 10% 2426 2427 sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil, GibcoTM, référence 10270-106), 2428 1% pénicilline/ streptomycine (Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), GibcoTM, référence 15140-122), 1% HEPES (GibcoTM, référence 15630-056), 1% pyruvate (GibcoTM, référence 2429 11360-039), 1% acides aminés non essentiels (GibcoTM, référence 11140-035) et à 4mM 2430 glutamine (L-Glutamine (200mM), GibcoTM, référence 25030-024). 48 heures post-2431 2432 électroporation, les surnageants de culture sont récoltés afin de mesurer la consommation de 2433 glucose dans les différentes conditions.

Sauf indication contraire dans le manuscrit, les cellules sont récupérées 48 heures postélectroporation afin d'évaluer l'effet sur la réplication du DENV selon les méthodes décrites
dans le paragraphe « Infections en laboratoire de confinement de niveau 2 ».

2437 II. Infections et électroporations des cellules avec le DENV

2438

2439 Les infections ont été réalisées avec des génomes viraux de sérotype 2 de la souche 2440 virale 16681 du DENV issue de l'épidémie thaïlandaise de 1964 et sous clonée dans le 2441 plasmide pFK. Ces génomes contiennent soit la séquence codante entière du DENV à laquelle 2442 a été ajouté, en amont, le gène de la protéine de fluorescence verte (eGFP) ou bien 2443 uniquement la séquence des protéines non-structurales du virus avec en amont la séquence 2444 codant le rapporteur rénilla-luciferase (rLuc). Ces plasmides ont été construits et 2445 gracieusement donnés par le laboratoire du Professeur Ralf Bartenschlager, Centre de 2446 recherche en cancérologie d'Allemagne, Heidelberg.



2447 <u>Figure 37 :</u> Représentations schématiques des constructions DENV utilisées pour l'étude

2448 (1) Représentations des séquences génétiques des DENV entier couplé au rapporteur eGFP (a)

ou bien subgénomique et couplé au rapporteur rLuc (b).

(2) Représentation des séquences complémentaires de virus entier et couplé à la GFP en (a)
ou bien subgénomique et couplé au rapporteur rLuc (b) dans le vecteur pFK utilisé pour la
production de virus ou de réplicon respectivement. Le promoteur SP6 exprimé dans ces
vecteurs permettra la production des ARN viraux comme décrit au paragraphe suivant.

SP6, région promotrice de la polymérase de type SP6, NTR, régions non-traduites, CS,
duplication de la séquence codant la capside permettant la cyclisation, eGFP, séquence
codante la protéine de fluorescence verte GFP, C, séquence codant les protéines de capside,
PrM, séquence codante les protéines pré-membranaires, E, séquence codante les protéines
d'enveloppe, NS1-5, séquence codante les protéines non-structurales 1 à 5, XBaI, site de
restriction de l'enyzme XbaI, AmpR, gène de résistance à l'ampicilline, ori, site à l'origine de
la réplication, rop, répresseur de l'amorce.

2461

1) Production des ARNs viraux

2462

2463 Les plasmides présentés ci-dessus ont tout d'abord été amplifiés par transformation en 2464 bactéries compétentes de type DH5a (Library EfficiencyTM DH5a Competent Cells, 2465 Invitrogen, référence 18263012) : 50µL de bactéries ont été incubées avec 1µL de plasmide 2466 pendant 20 minutes sur glace avant d'être placées à +42°C pendant 40 secondes. Elles sont 2467 ensuite ensemencées en boite de pétri afin d'en isoler une colonie qui est ensuite ensemencée 2468 en culture liquide (LB Broth Lennox, Sigma-Aldrich, référence L3022) contenant de 2469 l'ampicilline (Sigma-Aldrich, référence A9518-10G) comme antibiotique de sélection. 2470 Chaque étape de culture s'effectue à 37°C, 5% CO₂ pendant 12 heures. Le lendemain, les 2471 cultures liquides sont centrifugées à +4°C pendant 30 minutes à 4000g. Les surnageants sont 2472 ensuite éliminés de façon à ne conserver que les culots. Ces culots contenant les plasmides 2473 d'intérêt sont alors traités suivant le protocole classique de purification d'ADN plasmidique 2474 de Macherey-Nagel (NucleoBond® Xtra Midi EF, Macherey-Nagel, référence 740420-50). 2475 Les culots de plasmides purifiés sont repris dans 100µL d'eau bioMérieux (API® Suspension 2476 Medium, BioMérieux SA 3mL, référence : 70640).

2477 Les concentrations des plasmides ainsi purifiés ont été dosées grâce à un nanodrop 2478 (DeNovix DS-11) et ajustées à $1\mu g/\mu L$. 40 μg de plasmides ont été linéarisés par digestion 2479 enzymatique avec $3\mu L$ d'enzyme XbaI (XbaI, New England BioLabs $\mathbb{R}_{Inc.}$, 20,000 U/mL, 2480 référence #R0145S) dilués dans 10 μL de tampon CutSmart et complétés à 100 μL final d'eau 2481 bioMérieux, pendant 2 heures à 37°C. Au cours du processus de linéarisation après 1 heure et 2482 30 minutes d'incubation, la digestion des plasmides a été vérifiée par prélèvement d'un 2483 microlitre de solution en cours de lyse diluée avec 4µL d'eau bioMérieux et chargée avec 2µL 2484 de tampon de charge violet (Gel loading dye Purple (6X), New England BioLabs®_{Inc.}, référence #B7024S). Le mix contenant l'ADN digéré a été déposé en gel d'agarose à 1%, 2485 2486 préalablement préparé à partir d'une poudre d'agarose (Agarose D5, Euromedex, référence D5-E) diluée en eau distillée (H₂O OTEC, laboratoire Aguettant, référence 600499) et à 2487 laquelle a été ajouté du SYBR-safe dilué au 1X (SYBR® Safe DNA gel stain, InvitrogenTM, 2488 2489 S33102) permettant ainsi une visualisation des fragments d'ADNs post-migration aux 2490 rayonnements ultraviolets. La migration a été réalisée sous 135V (Mupid® exu Submarine electrophoresis system, Mupid®) pendant une trentaine de minutes en tampon tris-acétate 2491 EDTA (UltraPureTM 10X TAE Buffer, 10X, Invitrogen, référence 15558-026) diluée au 1X en 2492 2493 eau distillée réalisée extemporanément.

Les 30 dernières minutes, 1µL d'enzyme XbaI a été ajouté au reste du mix en cours de digestion afin d'assurer une complète linéarisation des plasmides. Les plasmides linéarisés ont été ensuite conservés à -20°C jusqu'au jour de production des ARNs.

2497 La production des ARNs est réalisée à l'aide du kit Ambion spécifique du promoteur SP6 (mMESSAGE mMACHINETM SP6 Transcription Kit, InvitrogenTM, référence AM1340). 2498 2499 L'ensemble de la production est réalisé avec du matériel et en zone traités pour l'absence de 2500 nucléases. 1µg de plasmides contenant le génome viral linéarisés sont incubés à 37°C pendant 2501 3 heures avec 2µL d'enzyme dilués dans un mix contenant 10µL de rNTP 2X/cap, 2µL de 2502 buffer 10X, 1µL GTP et ajustés à 20µL final en eau bioMérieux. L'étape de transcription des 2503 ADNs en ARNs est arrêtée par traitement avec 30µL d'eau distillée et 30µL de chlorure de 2504 lithium avant d'être placé à -20°C pour 30 minutes. Elle est ensuite centrifugée à pleine 2505 puissance pendant 15 minutes à +4°C. Seuls les culots sont conservés et lavés à l'éthanol 70% 2506 avant d'être séchés puis repris dans 30µL d'eau bioMérieux. Les ARNs produits sont 2507 conservés au moins une nuit à -80°C. Le lendemain ou le jour de leur utilisation, ces ARNs 2508 sont décongelés sur glace, dosés au nanodrop, ajusté à $1\mu g/\mu L$ et aliquotés à raison de $10\mu L$ par tube qui seront conservés à -80°C et décongelés une seule fois pour électroporation 2509 2510 évitant ainsi les cycles de congélation/décongélation délétères à la conservation d'ARNs de 2511 qualité. Chaque stock d'ARNs de rSg produit est testé par électroporation suivi d'une lecture 2512 de luminescence 4 heures post-électroporation selon le protocole expliqué au paragraphe 2513 suivant afin d'évaluer la qualité des ARNs produits in-vitro.

2514

2) Electroporations des ARNs

2515

2516 Les ARNs produits lors de la précédente étape sont électroporés dans les cellules en 2517 suspension reprises dans un milieu spécifique (cytomix) grâce à un électroporateur (Gene PulserTM, BioRad) paramétré sous 260V et relié à une capacitance externe (BioRad) ajustée à 2518 2519 960µFD. Pour ce faire, 1 litre de solution de cytomix est préalablement préparé : 120mM 2520 KCl, 0,15mM CaCl₂, 10mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH7,6, 25mM HEPES, pH 7,6, 2mM EGTA, 2521 pH7,6, 5mM MgCl₂, pH ajusté avec une solution de KOH. Chaque litre de solution de 2522 cytomix a ensuite été traité au diéthylpyrocarbonate (DEPC), agité jusqu'à dissolution complète des solutés, incubé pendant 12 heures à +37°C, autoclavé et aliquoté par lot de 2523 2524 50mL qui seront conservés à -20°C puis à +4°C une fois ouvert.

2525 Lors de l'électroporation, les cellules sont trypsinées comme lors d'un passage. Elles 2526 sont ensuite numérées avec un compteur automatique. Pour chaque électroporation, 4 millions 2527 de cellules sont conservées sur glace, lavées dans 400µL de PBS 1X puis 400µL de cytomix 2528 froids. Ensuite, ces 4 millions de cellules sont repris dans 400µL de cytomix froid et placés 2529 dans des cassettes d'électroporation de 0,4cm de large (Gene Pulser® Cuvette, BioRad, 2530 référence #1652088). 1µg d'ARN préalablement produit et décongelé extemporanément sur 2531 glace est alors injecté dans la cassette contenant les cellules sur glace et électroporées 2532 immédiatement. Afin d'augmenter la survie des cellules ainsi électroporées, la cuvette est 2533 laissée quelques minutes sous poste de sécurité microbiologique avant que les cellules soient 2534 reprises dans 10mL de milieux habituels de culture. Les cellules sont prélevées avec soin en 2535 veillant à ne pas prélever la mousse superficielle contenant des cellules mortes suite à 2536 l'impulsion électrique. Les cellules sont ensuite ensemencées classiquement en plaques de 2537 culture 24 puits à raison de 1mL de suspension cellulaire et cultivées comme indiqué plus 2538 haut.

2539

3) Analyse de la réplication en laboratoire de confinement de niveau 2

2540

Pour le virus DENV sous forme de rSg, l'étape d'électroporation de l'ARN est réalisée directement sur les cellules hépatocytaires. Pour chaque expérience menée, un temps de sortie 4 heures post-électroporation a été réalisé afin de vérifier la bonne expression du virus et avoir un temps normalisateur de la quantité d'ARN effectivement électroporée lors de chaque expérience. Afin de normaliser les conditions de culture et de s'affranchir de toute contamination du milieu par des débris de cellules mortes lors de l'électroporation, le milieu des cellules est remplacé, à 4 heures post-électroporation, par un milieu neuf. L'effet de composés chimiques ou de différents milieux de culture sur la réplication du DENV a été testé en ajoutant ces composés ou milieux lors du changement de milieu à 4 heures postélectroporation. Si ces composés ne peuvent pénétrer librement dans les cellules, ils sont électroporés en même temps que l'ARN DENV.

Pour chaque temps de sortie les surnageants ont été récoltés pour analyse ultérieure, centrifugés à +4°C pendant 5 minutes à 2000 rpm puis conservés à -20°C ou conservés à +4°C s'ils sont utilisés le jour même. Les tapis cellulaires sont lavés une fois au DPBS lysés grâce à un tampon de lyse passif commercial (Passive Lysis 5X Buffer, Promega, référence E1941) pendant 20 minutes à TA. La luminescence rLuc des lysats obtenus est dosée grâce à un kit de mesure de luminescence de la rénilla (Renilla-GloTM Luciferase Assay System, Promega, référence E2720).

L'analyse du niveau de réplication du réplicon DENV est interprétée par rapport à l'intensité du signal de luminescence luciférase émis et quantifié grâce à un spectrofluorimètre (Infinite M200, TECAN). Les valeurs de luminescence obtenues pour chaque test de sortie sont normalisées par rapport à celles obtenues 4 heures post-électroporation.

- 2563
- 2564

4) Production des stocks de virus au laboratoire de confinement de niveau 3

2565

2566 Pour la production de particules virales, 6 millions de cellules BHK-21 sont 2567 électroporées avec l'ARN complet du virus et reprises dans 10mL de milieu de culture comme expliqué au paragraphe sur « L'électroporation des ARNs » et ensemencées dans une 2568 flasque de 150cm². Les cultures sont alors immédiatement transportées au sein du laboratoire 2569 de sécurité de niveau 3 où elles sont placées dans un incubateurs à 5% CO₂ avec une pression 2570 2571 saturante en eau et à une température de +37°C pour une durée de 12 à 16 heures. Le lendemain, le milieu de culture des cellules est changé et remplacé par 15mL de milieu 2572 DMEM-glutaMAXTM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoTM, référence 61965-026) 2573 supplémentés avec 2% sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil, GibcoTM, 2574 référence 10270-106) et 1% d'HEPES (GibcoTM, référence 15630-056). Les cellules sont de 2575 nouveau incubées pendant 48 à 72 heures (jusqu'à apparition d'un effet cytopathique). 2576 2577 Lorsque le tapis cellulaire présente des marques d'infection (zone de lyse) le surnageant de 2578 culture est récupéré et filtré à 0,45µm. Ces surnageants sont alors aliquotés par 1mL et 2579 stockés à -80°C.

2580 La seconde phase de production consiste en une infection en cellules véro à partir des 2581 surnageants de cellules BHK-21 infectées. Pour cela, la veille de l'infection, les cellules véro sont ensemencées à raison de 6 millions de cellules dans une flasque de 150cm² dans le 2582 2583 milieu de culture classique. Le lendemain, elles sont transportées au sein du laboratoire de 2584 sécurité de niveau 3. Le milieu de culture des cellules est changé et remplacé par 15mL de milieu de DMEM-glutaMAXTM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoTM, référence 2585 61965-026) supplémentés avec 2% de sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum, qualified, 2586 Brazil, GibcoTM, référence 10270-106) et 1% d'HEPES (GibcoTM, référence 15630-056) puis 2587 les cellules sont incubées comme précédemment, pour la première phase de production. Lors 2588 2589 de l'apparition d'un effet cytopathique, le surnageant de culture est récupéré et filtré à 2590 0,45µm. Ces surnageants sont alors aliquotés par 1mL et stockés à -80°C. Ils constituent les 2591 stocks de virus avec lesquels les expériences seront réalisées.

2592 Ces stocks de virus sont ensuite titrés grâce à des cellules véro ensemencées la veille 2593 en plaque 96 puits à raison de 40 000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont lavées deux fois au DPBS puis infectées à différentes dilutions des stocks viraux (de 10⁻² à 10⁻⁸) en 2594 hexaplicats. Les stocks viraux ont été dilués dans un milieu DMEM-glutaMAXTM (Dulbecco's 2595 Modified Eagle Medium, GibcoTM, référence 61965-026) supplémenté avec 2 % de sérum de 2596 veau fœtal (Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil, GibcoTM, référence 10270-106) et 1% 2597 pénicilline/ streptomycine (Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), GibcoTM, référence 2598 2599 15140-122). Chaque plaque infectée est centrifugée à 1500rpm pendant 5 minutes puis incubée pendant 72 heures à +37°C, 5% CO₂. 2600

2601 72 heures post-infection chaque plaque est minutieusement lavée 2 fois au DPBS puis les 2602 cellules sont fixées par une solution de 4% de paraformaldehyde pendant 20 minutes à TA 2603 avant élimination de la solution de fixation et immersion en DPBS. La solution de fixation a 2604 été réalisée extemporanément par dilution d'une solution stock de formaldéhyde 2605 (Formaldehyde solution, Sigma-Aldrich, référence 47608-250) en DPBS.

2606

5) Infections réalisées au laboratoire de confinement de niveau 3

- 2607

2608 Les cellules HuH7 ou HuH7 HK4+ HK2- ont été ensemencées en plaques P24 à raison 2609 de 80 000 cellules par puits la veille de l'infection en milieu de routine.

2610 Au moment de l'infection, les plaques sont transportées jusqu'au laboratoire L3 où le milieu de culture est aspiré et les tapis cellulaires sont lavés deux fois avec une solution de DPBS. 2611 Elles sont ensuite infectées à une MOI de 1 dans 300µL d'OPTI-MEMTM 1X (Opti-MEM I 2612

Reduced Serum Medium, GibcoTM, référence 31985-062), centrifugées à 1500 rpm pendant 5
minutes à TA puis incubées pendant 4 heures à +37°C, 5% CO₂.

Au bout de 4 heures, l'inoculum est retiré et remplacé par du milieu DMEM (DMEM, 2615 no glucose, no glutamine, non phenol red, GibcoTM, référence A14430-01) supplémenté 2616 extemporanément avec 10% de sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil, 2617 GibcoTM, référence 10270-106), 25mM de glucose (GibcoTM Glucose Solution, GibcoTM, 2618 référence A24940-01), 1% pénicilline/ streptomycine (Penicillin-Streptomycin (10,000 2619 U/mL), GibcoTM, référence 15140-122) et 4mM glutamine (L-Glutamine (200mM), GibcoTM, 2620 2621 référence 25030-024). Les cellules infectées sont placées dans un incubateur à 5% CO₂ à 2622 pression saturante en eau et à la température de +37°C pour une durée de 24 à 72 heures en 2623 fonction du temps d'étude.

2624 A chaque temps de sortie, des prélèvements de surnageants ont été récupérés sur glace 2625 et centrifugés à +4°C pendant 5 minutes à 2000 rpm. Ces surnageants ont ensuite été 2626 conservés à -80°C en vue d'une titration et/ou quantification des ARNs viraux par RT-qPCR. 2627 Les tapis cellulaires ont été lavés deux fois au DPBS puis trypsinés (0,05% Tryspine EDTA 1X, GibcoTM, référence 25300-054) récoltés et culotés. Les culots ont ensuite été lavés au 2628 2629 DPBS avant d'être fixés grâce à une solution à 4% de paraformaldehyde (Formaldehyde 2630 solution, Sigma-Aldrich, référence 47608-250) comme préalablement décrit. Chaque culot 2631 cellulaire a ensuite été repris dans 100µL de DPBS et analysé par cytométrie en flux grâce à la protéine de fluorescence verte dont l'expression est associée au génome viral. 2632

2633 III. Analyse des résultats de cytométrie en flux

2634

Les cellules sont analysées par cytométrie en flux après excitation par un faisceau laser de 488nm d'un CantoTM II (BD FACSCantoTM II, BD Biosciences). L'acquisition est classiquement réalisée sur 10 000 cellules. Les résultats obtenus ont été interprétés grâce au logiciel informatique FlowJOTM (FlowJOTM version 10, BD Biosciences).

IV. Titration virale par FFU

2640

Le dosage du titre infectieux est réalisé sur cellules Véro. Les cellules Véro sont ensemencées la veille de l'infection en plaques 96 puits à raison de 40 000 cellules par puits dans leur milieu de culture habituel. Le lendemain les tapis cellulaires sont lavés une fois au DPBS afin d'éliminer le SVF.

Des dilutions en série (de 10⁻² à 10⁻⁸) à partir de surnageants de cultures infectées et conservés 2645 à -80°C, sont réalisées en milieu DMEM-glutaMAXTM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 2646 GibcoTM, référence 61965-026) supplémenté avec 2% de sérum de veau fœtal (Fetal Bovine 2647 Serum, qualified, Brazil, GibcoTM, référence 10270-106) et 1% pénicilline/ streptomycine 2648 (Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), GibcoTM, référence 15140-122). Six puits de culture 2649 2650 sont infectés pour chaque dilution de la suspension virale à titrer. Les plaques sont ensuite 2651 centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes à TA puis incubées pendant 4 heures à +37°C, 5% 2652 CO_2 .

72 heures post-infections, les plaques sont lavées au DPBS puis les cellules sont fixées
grâce à une solution à 4% de paraformaldehyde comme décrit en fin de paragraphe
« Production des stocks de virus au laboratoire de confinement de niveau 3 ».

2656 Les puits sont ensuite analysés en microscopie de fluorescence pour l'expression de la eGFP.

2657 Chaque cellule infectée apparait alors verte. Le nombre de foyers de cellules infectées est2658 compté pour chacun des puits.

Le calcul de la FFU/mL est ensuite réalisé par comptage du nombre moyen de puits positifs pour une dilution donnée en tenant compte du facteur de dilution et exprimé en mL de surnageants infectieux.

2662 V. Extraction des ARNs viraux des surnageants

2663

Les ARNs contenus dans les surnageants des cellules infectées ont été purifiés grâce au kit QIAmp (QIAamp® 96 virus QIAcube® HT Kit (5), Qiagen, référence 57731). Ils ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à l'étape suivante de transcription inverse (RT, de l'anglais « reverse transcription »).

- 2668 VI. RT-qPCR des ARNs viraux
- 2669

Les ARNs doivent tout d'abord être rétro-transcrits en ADNs complémentaires (ADNc). Cette réaction est assurée par une transcriptase inverse en appliquant le protocole du kit fourni par Thermo-Scientific (High Capacity RNA-to-cDNA, Applied Biosystems TM, référence 4387406). Ces ADNc serviront d'échantillons pour la PCR quantitative qui suit (ils sont dilués au ¹/₄ s'ils sont issus d'ARN de culots cellulaires ou bien au ¹/₂ s'ils sont issus d'ARN de surnageants). Ils sont aliquotés et stockés à -20°C. La qPCR est réalisée à partir de ADNc préalablement synthétisés grâce au thermocycleur BioRad (CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System, BioRad). La quantification des brins nouvellement synthétisés est assurée par l'ajout d'un agent intercalant de l'ADN et fluorescent (FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), Roche, référence 04913914001) permettant ainsi un suivi quantitatif en temps réel. L'amplification du génome viral est permise par l'ajout d'amorces spécifiques de la séquence génique.

2682 L'amplification est réalisée en trois temps : première étape de dénaturation du double-brin 2683 d'ADN à +95°C pendant 5 minutes. Une phase d'amplification de 40 cycles avec un 2684 enchaînement, en boucle, de 10 secondes à +95°C suivi de 30 secondes à +60°C. Enfin une 2685 phase de dissociation par augmentation croissante par tranche de +0,5°C de la température 2686 jusqu'à atteindre la température de +95°C.

2687

En parallèle de l'amplification d'échantillon, une gamme standard d'amplification utilisant les mêmes amorces est réalisée permettant la quantification relative de l'amplification de l'ADN de l'échantillon. Cette gamme a été produite à partir d'ADN de plasmides pFK-DV2-eGFP et pFK-DV2 dilués et dont l'amplification a été préalablement vérifiée permettant de déterminer l'efficacité du couple d'amorces utilisé.

L'analyse de la température pour laquelle 50% de l'ADN amplifié est sous forme d'un double brin (Tm) permet de contrôler la spécificité d'accroche des amorces au gène d'intérêt. Un contrôle de non-amplification, ne contenant que de l'eau, permet de vérifier l'absence de contamination et d'amplification parasite.

VII. Transfection des cellules pour l'expression des protéines virales NS ou d'enzymes cellulaires humaines

2699

La transfection pour l'expression de protéines virales ou humaines impliquées dans le métabolisme cellulaire a été réalisée à l'aide d'un agent chimique de transfection commercialisé (JetPEITM, Polyplus). Pour les cellules hépatocytaires, le JetPEI®-Hepatocyte (Polyplus, référence 102-05N), réactif spécifique à ces cellules, a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant.

Pour d'autres types cellulaires, dont les cellules HEK-293T, la transfection a été réalisée
grâce à une solution de JetPEI® standard (Polyplus, référence 101-10) en suivant les
recommandations standards.

2708 Quelle que soit la solution de JetPEI® utilisée, les cellules sont ensemencées la veille 2709 de la transfection en adaptant la quantité de cellules au format de culture de façon à ce que ces 2710 dernières soient à une confluence comprise entre 50% et 60% au moment de la transfection.

Pour chaque plasmide transfecté, un mix NaCl-ADN plasmidique ainsi qu'un mix NaClJetPEI® sont réalisés et vortexés doucement. Le mix contenant le JetPEI® est alors ajouté au
mix d'ADN, vortexé et incubé pendant 30 minutes à TA. Après quoi, chaque puits contenant
les cellules à transfecter a été traité avec le volume de transfection nécessaire à une
transfection efficace.

Les séquences codantes pour les différentes protéines à exprimer sont clonées, hors expérience de « NanoLuc Two Hybrids », dans un plasmide exprimant le rapport flag à résistance ampicilline (pCi-Néo-3xFlag (simplifié en p3xFlag) donné gracieusement par Yves Jacob, Institut Pasteur, Paris). Les protéines humaines du métabolisme sont exprimées dans un plasmide exprimant une sous-unité du rapporteur gaussia luciférase à sélection ampicilline (pGLuc1 créé et donné gracieusement par Yves Jacob, Institut Pasteur, Paris).

Plasmide utilisé	Expérience(s) réalisée(s)
pGLuc1 vide	PCA, CoIP
pGLuc1 HK1	CoIP
pGLuc1 HK2	CoIP
pGLuc1 HK3	CoIP
pGLuc1 HK4	CoIP
pGLuc1 GLUD2	CoIP
pGLuc1 NS3 entière	PCA
pGLuc2 vide	PCA
pGLuc2 ACLY	PCA
pGLuc2 ALDOA	PCA
pGLuc2 ALDOB	PCA
pGLuc2 ASNS	PCA
pGLuc2 CPT1A	PCA
pGLuc2 CS	PCA
pGLuc2 DLAT	PCA
pGLuc2 DLD	PCA
pGLuc2 DLST	PCA

pGLuc2 ECHS1	PCA
pGLuc2 ENO1	PCA
pGLuc2 ENO2	PCA
pGLuc2 ENO3	PCA
pGLuc2 FBP1	PCA
pGLuc2 FH	PCA
pGLuc2 G6PC	PCA
pGLuc2 GAPDH	PCA
pGLuc2 GCK	PCA
pGLuc2 GLUD2	PCA
pGLuc2 GOT1	PCA
pGLuc2 GOT2	PCA
pGLuc2 HK1	PCA
pGLuc2 HK2	PCA
pGLuc2 HK3	PCA
pGLuc2 IDH1	PCA
pGLuc2 IDH2	PCA
pGLuc2 IDH3B	PCA
pGLuc2 IDH3G	PCA
pGLuc2 LDHA	PCA
pGLuc2 LDHB	PCA
pGLuc2 LDHC	PCA
pGLuc2 LDHD	PCA
pGLuc2 MDH1	PCA
pGLuc2 MDH2	PCA
pGLuc2 OGDH	PCA
pGLuc2 PC	PCA
pGLuc2 PDHA1	PCA
pGLuc2 PDHB	PCA
pGLuc2 PFKL	PCA
pGLuc2 PFKM	PCA
pGLuc2 PFKP	PCA
pGLuc2 PGAM2	PCA

pGLuc2 PGK1	PCA			
pGLuc2 PGK2	PCA			
pGLuc2 PGM1	PCA			
pGLuc2 PGM2	PCA			
pGLuc2 PKM2	PCA			
pGLuc2 SDHA	PCA			
pGLuc2 SDHC	PCA			
pGLuc2 SDHD	PCA			
pGLuc2 SUCLA2	PCA			
pGLuc2 TPI1	PCA			
pCiNéo-3xFlag	CoIP, consommation de glucose, sécrétion de lactate,			
Gateway vide	quantification/marquage de lipides neutres intracellulaires			
pCiNéo-3xFlag Gateway	CoIP, consommation de glucose, sécrétion de lactate,			
NS3 DENV entière	quantification/marquage de lipides neutres intracellulaires			
pCiNéo-3xFlag Gateway	CoIP, consommation de glucose, sécrétion de lactate,			
NS3 DENV protéase	quantification/marquage de lipides neutres intracellulaires			
pCiNéo-3xFlag NS3	CoIP, consommation de glucose, sécrétion de lactate,			
Gateway DENV hélicase	quantification/marquage de lipides neutres intracellulaires			

2722 <u>Tableau 6 :</u> Les différents plasmides utilisés pour la transfection de cellules pour
2723 l'expression de protéines virales NS et d'enzymes cellulaires humaines.

2724

2725 Les cellules ainsi transfectées sont ensuite cultivées comme décrit spécifiquement
2726 pour chaque expérience.

2727 VIII. Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par

2728

Western-Blot

2729

La lyse des cellules est réalisée sur glace dans une solution de Tris-HCl (Tris HCl 20mM, Tris HCl 20mM, EDTA 1mM, 0.5% NP40) de pH 7.4. Des inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, référence P8340-5ML) sont ajoutés extemporanément au moment de la lyse. Après 20 minutes de lyse, les cellules sont centrifugées à 17 000g pendant également 20 minutes à +4°C. Les surnageants sont récupérés et utilisés pour le dosage. Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Lowry (DCTM protein Assay, BioRad, référence 500-0116). La quantification des protéines dans les échantillons est réalisée contre une gamme de dilution de protéines de sérum de bœuf (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, référence A7906-100G). Les densités optiques sont mesurées à 750nm au spectrofluorimètre (Infinite M200, TECAN).

Lorsque le dosage par cette technique n'était pas possible (notamment à cause de problème d'interaction entre les réactifs du dosage Lowry et des tampons de lyse des cellules), les protéines contenues dans les lysats ont été dosées à l'aide d'un nanodrop (DeNovix DS-11).

2745 Afin d'analyser l'expression des protéines par western-blot, les lysats protéiques sont dilués en solution dénaturante (4X Laemmli Sample Buffer, BioRad, référence #161-0747), 2746 2747 additionné de 1,4mM final de β-mercaptoéthanol (2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, 2748 référence M3148). Les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à +96°C avant d'être déposés sur gels de polyacrymalide (NuPAGETM 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen, référence 2749 2750 NP0335BOX). Le poids moléculaire des protéines analysées est contrôlé à l'aide d'un standard de migration commercial (PageRulerTM Plus Prestrained Protein Ladder, Thermo-2751 ScientificTM, référence #26619). 2752

La migration est effectuée en mini-cuve à gel (Mini Gel Tank, Invitrogen[™] A25977)
en tampon MOPS (NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer 20X, novex®, référence NP0001)
sous 150 volts pendant 1 heure 30 minutes à 2 heures (PowerPac[™] Basic Power Supply,
BioRad).

L'électrotransfert transfert sur membrane de nitrocellulose est effectué en système 2757 semi-sec grâce à l'appareil de transfert BioRad (Trans-Blot® TurboTM Transfert System) en 2758 utilisant le programme spécifique aux gels de 1,5mm et le matériel de transfert adapté (Trans-2759 Blot® TurboTM RTA Transfer Kit, Nitrocellulose, BioRad, référence #1704271). Les 2760 2761 membranes sont ensuite saturées en solution pendant 1 heure à TA ou bien sur la nuit à +4°C. 2762 Chaque solution de saturation, lavage et dilution d'anticorps est réalisée en PBS1X 2763 (Phosphate buffered saline powder, pH 7,4, Sigma-Aldrich, référence P3813-10PAK) dilué en 2764 eau distillée et complété au 1X Tween 20 (10% Tween 20 Solution, BioRad, référence #161-2765 0781). 5% de poudre de lait ont été ajoutés lors de la préparation des solutions de saturation et 2766 de dilution d'anticorps (lorsque cela était préconisé).

2767 Ces anticorps étaient soit directement couplés à l'enzyme de peroxydase de raifort (HRP) soit
2768 non conjugués nécessitant alors une incubation avec un anticorps secondaire lui-même couplé

2769 à la protéine HRP. Les différents anticorps et différentes dilutions utilisées pour l'étude sont

2770 détaillés dans le tableau ci-dessous.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Hôte	Conjugué HRP	Dilution	Poids de la protéine détectée (kDa)
Anti- Actine	Cell Signaling Technology®	8457	Lapin	Non	1/1000 ^{ème}	42
Anti- FLAG® M2	Sigma- Aldrich	A8592	Souris	Oui	1/10000 ^{ème}	/
Anti- GKRP	Santa-Cruz Biotechnology	sc-74552	Souris	Non	1/100 ^{ème}	68
Anti-GLuc	New England BioLabs® _{Inc.}	E8023S	Lapin	Non	1/1000 ^{ème}	/
Anti-Glut1	ProteinTech	66290-1-Ig	Souris	Non	1/1000 ^{ème}	55
Anti-Glut2	ProteinTech	20436-1-AP	Lapin	Non	1/1000 ^{ème}	57
Anti-Glut3	ProteinTech	20403-1-AP	Lapin	Non	1/1000 ^{ème}	52
Anti-Glut4	GeneTex	GTX60674	Souris	Non	1/1000 ^{ème}	55
Anti-Glut5	Santa-Cruz Biotechnology	sc-271055	Souris	Non	1/1000 ^{ème}	60
Anti-HK1	Cell Signaling Technology®	2024	Lapin	Non	1/1000 ^{ème}	100
Anti-HK2	Cell Signaling Technology®	2867	Lapin	Non	1/1000 ^{ème}	100
Anti-HK3	GeneTex	GTX111409	Lapin	Non	1/1000 ^{ème}	100
Anti-HK4	Santa-Cruz Biotechnology	sc-7908	Lapin	Non	1/1000 ^{ème}	50
Anti- PCNA3	ProteinTech	60097-1-Ig	Souris	Non	1/5000 ^{ème}	35
Anti-souris	Jackson	115-035-174	Chèvre	Oui	1/10000 ^{ème}	/

HRP	Immuno					
	Research					
Anti Ionin	Jackson					
	Immuno	211-032-171	Souris	Oui	1/10000 ^{ème}	/
ΠΚΓ	Research					

2771 <u>Tableau 7 :</u> Récapitulatif des différents anticorps utilisés.

2772

La détection de l'immunomarquage des protéines est réalisée par une solution de substrat de l'enzyme HRP de forte (SuperSignalTM West Pico PLUS ChemiLuminescent Substrate, protein biology, référence 34580) ou très forte sensibilité (SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate, protein biology, référence 34096). L'acquisition des photographies de membranes est réalisée à l'aide d'un quantificateur de chemiluminescence (ImageQuantTM LAS4000, GE Healthcare Life Sciences).

2779 L'interprétation des images a été réalisée à partir du logiciel ImageJ (ImageJ, NIH).

IX. Etude de l'interaction de la protéine non-structurale NS3 du DENV avec les HKs et GKRP

- 2/81
- 2782 1) Crible par complémentation protéique (PCA)
- 2783

2784 Un crible d'interaction utilisant la technique de complémentation protéique (PCA, 2785 Protein Complementation Assay) entre la protéine NS3 DENV entière et les protéines 2786 humaines du métabolisme cellulaire avait été précédemment réalisé dans l'équipe. Pour ce 2787 faire, l'ORF codante pour la protéine NS3 entière du DENV a été fusionnée avec la moitié de 2788 la protéine rapportrice Gaussia Luciférase (pGluc1-NS3). En parallèle, chaque ORF codante 2789 pour une protéine du métabolisme humain a été fusionnée avec la seconde moitié, 2790 complémentaire, de cette même protéine rapportrice (pGluc2-X). Les différentes 2791 constructions ont ensuite été transfectées dans des cellules HEK293T ensemencées 24 heures avant la transfection à une densité de 35 000 cellules par puits en plaques 96 puits blanches à 2792 2793 fond blanc (Greiner Bio-One, référence 655073). Les cellules ont été transfectées avec 100 ng 2794 de pGluc1-NS3, 100 ng d'un plasmide contenant une protéine du métabolisme cellulaire 2795 pGluc2-X ainsi qu'un plasmide contenant la luciférase firefly afin de normaliser l'efficacité 2796 de transfection. 24 heures post-transfection, les cellules sont récupérées, lysées et l'intensité de fluorescence obtenue est mesurée par un spectrofluorimètre (Infinite M1000 PRO,
TECAN) après ajout de réactifs spécifiques de la Gaussia et Firefly luciférase (Luciferase
Assay System, Promega). Chaque mesure a été effectuée en triplicats. Les résultats ont été
normalisés et exprimés en ratio de luminescence normalisé (NLR). Il correspond pour un
couple de protéines A et B testé à la luminescence mesurée dans les cellules exprimant
pGluc1-A et pGluc2-B divisée par la somme de la luminescence mesurée dans des cellules
transfectées avec pGluc1-A et pGluc2-vide et celle des cellules pGluc1-vide et pGluc2-B.

2804

2) Co-immunoprécipitation (CoIP)

2805

Les résultats du crible ont été vérifiés et affinés en testant l'interaction entre la protéine NS3 2806 2807 entière du DENV et les HKs cellulaires par coimmunoprécipitation. Pour ce faire, 3 millions 2808 de cellules HEK293T sont ensemencées en dish en milieu classique décrit préalablement afin 2809 d'obtenir une confluence d'environ 60% au moment de la transfection. Le lendemain, ces 2810 cellules sont transfectées (selon les modalités décrites plus haut dans la partie « Transfection 2811 de protéines virales NS ou d'enzyme cellulaire humaine ») à chaque fois avec deux plasmides 2812 soit vide soit contenant une protéine virale ou cellulaire (voir le tableau de l'ensemble des transfections réalisées ci-dessous). Les cellules sont incubées à +37°C, 5% CO₂ pour 48 2813 2814 heures.

Numéro de CoIP	Premier plasmide	Second plasmide
1	p3xFlag Vide	pGLuc1 Vide
2	p3xFlag NS3 entière	pGLuc1 Vide
3	p3xFlag Vide	pGLuc1 GLUD2
4	p3xFlag Vide	pGLuc1 HK1
5	p3xFlag Vide	pGLuc1 HK2
6	p3xFlag Vide	pGLuc1 HK3
7	p3xFlag Vide	pGLuc1 HK4
8	p3xFlag NS3 entière	pGLuc1 GLUD2
9	p3xFlag NS3 entière	pGLuc1 HK1
10	p3xFlag NS3 entière	pGLuc1 HK2

11	p3xFlag entière	NS3	pGLuc1 HK3
12	p3xFlag entière	NS3	pGLuc1 HK4

2815 <u>Tableau 8 :</u> Récapitulatif des différentes interactions testées.

2816

Au bout de 48 heures, le tapis cellulaire est décollé par aspiration-refoulement avec le milieu de culture. Les cellules sont lavées avec du DPBS avant centrifugation et congélation du culot sec à -20°C en attendant d'être lysées.

Les culots cellulaires sont lysés pendant 20 minutes sur glace dans 800 μl de tampon de lyse
(20mM Tris-HCl, pH 7,4 – 180mM NaCl – 1mM EDTA – 0.5% NP40) contenant les
antiprotéases 1X (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, référence P8340) ajoutées
extemporanément.

Les lysats obtenus sont centrifugés à 17 000g à +4°C pendant 20 minutes. Les surnagenants sont transférés dans un nouveau tube et conservés sur glace. La quantité de protéines obtenue dans chaque lysat est quantifiée de la même façon qu'un western-blot classique : protocole Lowry (DCTM protein Assay, BioRad, référence 500-0116) décrit plus haut dans cette partie.

200µg de protéines sont prélevés des lysats et dilués avec du Laemmli 4X (comme décrit pour
un western-blot classique) afin de constituer les futurs échantillons de lysats totaux. En
attendant le dépôt, ils sont conservés à -20°C.

Simultanément, des billes anti-FLAG (Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads -M8823 SIGMA) sont préparées afin d'effectuer la CoIP à proprement parler. Pour chaque interaction testée 30μ L de billes sèches seront utilisées. Afin de limiter la précipitation de protéines non spécifiques les billes reprises dans le tampon de lyse (360μ L pour 30μ L de billes sèches) sont tout d'abord saturées avec un homogénat de cellules HEK293T non transfectées, pendant 1 heure, à +4°C, sur roue. Elles sont prêtes à être utilisées.

2838 Le reste des lysats de cellules transfectées est alors incubé avec environ 100μL de billes
2839 saturées pendant 2h à +4°C sur roue.

Les phases de précipitations sont réalisées à l'aide d'un aimant permettant de conserver les billes en éliminant le surnageant. Les billes sont lavées trois fois en tampon de lavage (30mM Tris-HCl, pH 7,4 – 500mM NaCl – 1mM EDTA – 0.5% NP40). Une fois le tampon du dernier lavage éliminé, 50µL de laemmli 4X est ajouté sur les billes et le mix est
dénaturé 10 minutes à +96°C. Ce mix est conservé à -20°C jusqu'à l'analyse par western-blot.
Les western-blot « lysats totaux » et « CoIP » sont réalisés suivant le protocole décrit dans le
paragraphe « Dosage protéique et analyse d'expression des protéines par western-blot ». Idem
pour le transfert, la saturation, l'incubation avec les différents anticorps (anti-Flag M2 et antiGLuc) et la révélation.

2849

3) Le système nano-luciférase (NanoLuc two hybrid)

2850

2851 L'étude de l'interaction entre la protéine virale NS3 avec les HKs ainsi que la protéine 2852 GKRP a été réalisée par C. Kundlacz, post-doctorante au sein de l'équipe, en utilisant une 2853 nouvelle technique de détection des interactions protéine-protéine basée sur la 2854 complémentation de l'activité nano-luciférase (N2H, NanoLuc two-hybrid). Cette technique a 2855 été mise au point par l'équipe du Professeur Yves Jacob (Institut Pasteur, Paris) en 2856 collaboration avec le Professeur Marc Vidal (Harvard Medical School and Dana-Farber 2857 Cancer Institute, Boston) et le Docteur Pierre-Olivier Vidalain (CIRI, Lyon) (Choi et al., 2858 2019).

2859 Cette technique permet d'identifier de potentielles interactions entre deux partenaires 2860 protéiques en fusionnant chacun des deux fragments (F1 ou F2) de la nano-luciférase soit à 2861 l'extrémité N-terminale (N) soit à l'extrémité C-terminale (C) des protéines faisant ainsi tester 2862 8 combinaisons possibles pour un couple de protéines clonées. Pour tester une interaction, il 2863 est nécessaire d'utiliser des plasmides permettant l'expression des interactants potentiels en 2864 fusion avec la nano-luciférase à son extrémité N-terminale ou son extrémité C-terminale.



2865 <u>Figure 38</u>: Présentation des différentes combinaisons protéines-fragments de nano2866 luciférase.

2867

L'interaction entre deux protéines permet de reconstituer une nano-luciférase fonctionnelle dont la quantité de luminescence émise peut être mesurée au luminomètre (Mithras LB 940, BERTHOLD) à l'aide d'un substrat approprié qui est la furimazine. La furimazine est préparée par dilution dans une solution de DMSO et d'éthanol acide (HCl 12N et éthanol 100%). Cette solution est alors incubée à 50°C pendant 3 heures et aliquotée pour
être conservée à -80°C ou bien utilisée directement par dilution au 100^{ème}. La dilution est
effectuée en tampon de type MES 100mM pH6, 1mM CDTA, 0,5% Terigol, 0,05% Mazu
DF, 150mM KCl,

La veille de la transfection, 30 000 cellules HEK293T ont été ensemencées par puits de plaque 96 puits. Le lendemain, la transfection a été réalisée avec les plasmides contenant les différentes constructions des enzymes humaines testées et de NS3 (entière, protéase et hélicase) selon les recommandations du protocole JetPEI classique (Polyplus, référence 101-10).

Un seuil de positivité d'interaction est fixé par la luminescence obtenue par la somme de contrôles négatifs d'interactions. Toute valeur supérieure à ce seuil est considérée comme positive. En parallèle, un contrôle positif d'interaction du test a été réalisé par transfection de constructions plasmidiques contenant les séquences codantes pour deux protéines connues pour interagir entre elles.

- 2886 X. Fractionnement cellulaire
- 2887

La séparation des protéines des compartiments cytoplasmique, mitochondrial et nucléaire a été réalisée grâce à deux extractions successives accompagnées de centrifugations différentielles.

Après trypsination et lavage des cellules en DPBS, les culots de cellules sont repris dans
500µL de buffer de fractionnement. Ce buffer contient 100 mM HEPES, pH 7.9, avec 15 mM
MgCl₂ et 100 mM KCl (10x Lysis Buffer, hypotonic, Sigma-Aldrich, référence L9161) dilué
dans de l'eau distillée et supplémenté extemporanément avec un cocktail d'anti-protéases
(Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, référence P8340) et du dithiothréitol (DLDithiothreitol, Sigma-Aldrich, référence 43815).

2897 Les lysats obtenus sont laissés incuber pendant 15 minutes sur glace avant d'être 2898 passés par va-et-vient dans une seringue et aiguille de 26G (0,45mm de diamètre). Ils sont de 2899 nouveaux laissés 20 minutes sur glace puis centrifugés à 3 000 rpm pendant 5 minutes à 2900 +4°C. Les surnageants sont récupérés dans un tube neuf et maintenus sur glace en vue de 2901 l'extraction du compartiment mitochondrial. Les noyaux sont repris avec 500µL de tampon de 2902 fractionnement et de nouveau pipettés-refoulés dans une seringue et aiguille de 25G (0,5mm 2903 de diamètre). Ils sont centrifugés à 3 000 rpm pendant 10 minutes à +4°C. Seul le noyau est 2904 conservé, il est repris dans 100µL de tampon TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6) 2905 supplémenté avec 0,1% de SDS. Les lysats sont alors soniqués à l'aide d'une sonde (3 2906 secondes sur glace, +4°C, impulsion continue à 50% de la puissance maximale de la sonde) et 2907 conservés à -20°C en vue de la quantification protéique réalisée au nanodrop et l'analyse en 2908 western-blot.

2909 Les surnageants conservés jusqu'alors sur glace sont centrifugés à 8 000 rpm pendant 2910 5 minutes à $+4^{\circ}$ C afin de précipiter les mitochondries du cytoplasme. Les surnageants sont 2911 transférés en nouveaux tubes et conservés à -20°C et constitueront les fractions 2912 cytoplasmiques pour les analyses.

2913 Les culots contenant les mitochondries sont lavés avec 500µL de tampon de 2914 fractionnement centrifugés à 3 000 rpm, 10 minutes à +4°C. Les culots obtenus à la suite de 2915 ce lavage sont repris dans 100µL de tampon TBS contenant 0,1% SDS, soniqués puis 2916 conservés à -20°C. Ils constitueront les fractions mitochondriales lors des analyses par 2917 western-blot.

2918

XI. Marquage et quantification des lipides neutres intracellulaires

2919

2920 Afin d'évaluer la quantité de lipides neutres intracellulaires, deux approches ont été 2921 utilisées. Une première approche par marquage des lipides neutres intracellulaires et, à l'aide 2922 de sondes fluorescentes spécifiques, une approche par quantification des lipides contenus 2923 dans les cellules après leur lyse.

2924

1) Marquage Oil Red O (ORO) des gouttelettes lipidiques

2925

2926 Une solution de d'ORO (Oil Red O) est préparée : 0,08g de poudre d'ORO (Oil Red 2927 O, Sigma-Aldrich, référence O0625) repris dans 26mL d'isopropanol absolu. Après un 2928 mélange vigoureux, elle est laissée pendant 20 minutes à TA puis filtré à 0,22µm. Cette 2929 solution constitue un stock stable 1 an à TA.

2930

2931 Afin de permettre une observation du marquage au microscope, les cellules sont 2932 ensemencées sur lamelles préalablement coatées avec de la polylysine (Poly-L-lysine 2933 solution, Sigma-Aldrich, référence P4707).

2934

2935 48 heures post-transfection (soit 72 heures post-ensemencement), les tapis cellulaires 2936 sont lavés deux fois au DPBS. Les cellules sont fixées par une solution à 4% de

- 2937 paraformaldehyde (Formaldehyde solution, Sigma-Aldrich, référence 47608-250) pendant 15
- 2938 minutes à TA avant élimination de la solution de fixation et double lavage à l'eau distillée.
- 2939 Les cellules sont incubées avec de l'isopropanol à 60% pendant 5 minutes à TA.

2940 Le stock d'ORO est dilué (3/5^{ème} de solution stock diluée dans l'eau) pour constituer une

solution de travail. De la même façon que précédemment, le mix est mélangé vigoureusement,

- laissé 10 minutes à TA et filtré à 0,22µm. La solution est stable pendant 2 heures.
- 2943 400μL de la solution de travail ORO sont ajoutés par puits de P24 et incubés 15 minutes à
 2944 TA.
- 2945 Les cellules sont ensuite lavées délicatement à l'eau distillée jusqu'à élimination
 2946 complète de la solution de marquage.

2947 Les noyaux sont ensuite colorés au DAPI (NucBlue Fixed Cell Stain ReadyProbes reagent,

Thermo-ScientificTM, référence R37606) dilué dans du DPBS à raison de 1 goutte par mL de
DBPS1X. L'incubation se fait à TA pendant 5 minutes.

- 2950 Les cellules sont ensuite rincées trois fois à l'eau distillée.
- 2951 Les lamelles sont montées sur lame grâce au ProLong (ProLong™ Gold Antifade
 2952 Mountant, Thermo-Scientific[™], référence P36930).
- 2953

2) Marquage Bodipy® des lipides neutres intracellulaires

2954

Les tapis cellulaires sont lavés au DPBS puis marqués avec une solution de 4,4difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene ou BODIPY® 493/503 (BODIPY® Lipid Probes, Molecular Probes, référence D3922, CAS Number 121207-31-6) diluée au 1/500^{ème} en DPBS. Les cellules sont alors incubées à l'obscurité pendant 5 minutes $a + 37^{\circ}C$, 5% CO₂.

La solution de marquage est éliminée, les tapis sont de nouveaux lavés au DPBS de façon à éliminer tout marquage aspécifique et les cellules sont trypsinées. En parallèle, des puits contrôles non marqués au BODIPYTM sont incubés dans du DPBS et traités de façon semblable aux puits marqués de façon à éliminer l'auto-fluorescence des cellules lors des paramétrages du fluorimètre.

2965 L'ensemble des cellules est culoté et repris dans une solution de 7-amino-2966 actinomycine D (7-AAD, BD PharmingenTM, référence 559925) diluée en DPBS, avant d'être 2967 analysé par cytométrie en flux après excitation à 488nm.
2968

3) Quantification des triglycérides intracellulaires

2969

2970 La quantification des triglycérides intracellulaires a été réalisée grâce à un kit
2971 enzymatique spécifique (High Sensitivity Triglyceride Fluorometric Assay kit, Sigma2972 Aldrich, référence MAK264-1KT).

2973 Pour cela, les cellules ont été cultivées ou électroporées comme indiqué précédemment. Après 2974 72 heures de culture, les cellules sont trypsinées, lavées et comptées. Des culots de 1 million 2975 de cellules sont alors réalisés et traités selon le protocole préconisé par le fournisseur. Les dosages ont été effectués sur des lysats dilués au 1/100^{ème} en tampon spécifique et fourni avec 2976 le kit. L'analyse est réalisée en plaques traitées aux ultraviolets (Greiner UV-Star® 96 well 2977 2978 plates, Greiner, référence 655801). La fluorescence, résultat de la dégradation des 2979 triglycérides par les enzymes du mix réactionnel, est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre 2980 (Infinite M200, TECAN).

L'interprétation des résultats est faite à l'aide d'une gamme de dilution d'une solution
standard de triglycérides fourni également avec le kit. Les résultats présentés tiennent compte
des dilutions effectuées.

2984 XII. Dosage de la consommation cellulaire de glucose

2985

Les surnageants ont été décongelés sur glace ou directement utilisés post-récupération afin d'en quantifier la concentration en glucose. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un kit commercialisé par Sigma (Glucose (HK) Assay Reagent - GAHK-20, Sigma-Aldrich, référence 1002240932).

2990 Chaque surnageant testé est dilué au 1/5^{ème} en eau distillée. La préparation des 2991 échantillons est faite suivant le protocole proposé par le fournisseur. L'analyse est réalisée en 2992 plaques traitées aux ultraviolets (Greiner UV-Star® 96 well plates, Greiner, référence 2993 655801) et lues à 340nm au spectrofluorimètre (Infinite M200, TECAN).

2994 L'interprétation des résultats est permise grâce à une gamme de dilution à partir d'une 2995 solution de D-glucose de concentration 1mg/mL issue du kit de dosage. Les résultats 2996 présentés tiennent compte des dilutions effectuées et correspondent aux différences de 2997 glucose quantifié dans les milieux avant et après culture reflétant ainsi sa consommation. 2998 2999

XIII. Dosage de la sécrétion de lactate

XIV. Mesure d'activité hexokinase

- Comme pour la quantification du glucose, les surnageants d'intérêt ont été décongelés
 sur glace ou directement utilisés post-récupération afin d'en quantifier la concentration en
 lactate sécrété par les cellules. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un kit également
 commercialisé par Sigma (Lactate Assay Kit II, Sigma-Aldrich, référence MAK065-1KT).
 L'interprétation des résultats est réalisée de la même façon que pour le dosage glucose.
- 3005
- 3006
- 3007

3008 Les mesures d'activité enzymatique HK ont été réalisées sur des cellules simplement 3009 en culture, des cellules transfectées pour l'expression de différentes protéines ou bien 3010 électroporées selon les protocoles décrits ci-dessus. Les cellules ont dans tous les cas, été 3011 trypsinées, culotées, lavées et reprises dans un tampon d'homogénéisation spécifique (Tris-3012 HCl, 0,05M, saccharose 0,25M, EDTA 5mM pH 7,4, 2-mercapto-éthanol 0,005M, glucose 3013 0,01M). Après une incubation de 20 minutes sur glace avec homogénéisation environ toutes 3014 les 5 minutes, l'homogénat est centrifugé à 17 000g pendant 20 minutes à +4°C. Les 3015 surnageants ont été récupérés et regroupés par conditions identiques. Les lysats sont alors 3016 soniqués à l'aide d'une sonde (3 secondes sur glace, +4°C, impulsion continue à 50% de la 3017 puissance maximale de la sonde).

Les homogénats sont ainsi directement utilisés pour la mesure de l'activité
enzymatique en plaques traitées aux ultraviolets (Greiner UV-Star® 96 well plates, Greiner,
référence 655801). 40μL d'homogénats ont été utilisés pour réaliser un point de mesure.
Parallèlement, une gamme d'activité hexokinase est réalisée à partir de dilution d'hexokinase
purifiée de levure (Hexokinase from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich, référence
H4502-500UN). 10μL de chaque dilution sont utilisés pour constituer un point de gamme.

Pour chaque point (gamme ou échantillons) 250μL d'un mix réactionnel
(Triéthanolamine (Sigma-Aldrich, référence 90279) 0,05M pH=7,6, D-glucose (SigmaAldrich, référence 49139-50G) 0,555M, MgCl₂ (Sigma-Aldrich, référence M2670-100G)
0,1M NADP⁺ (Sigma-Aldrich, référence N5755-500MG) 0,014M, G6P-déshydrogénase
(Roche Diagnostics GmbH, référence 10165875001) 125U/ml, ATP (Amersham Biosciences,

3029 référence 27-1006-01) 0,019M) ont été ajoutés. Les quantités de chaque produit à ajouter
3030 sont indiquées dans le tableau ci-dessous. L'ATP est ajouté au dernier moment car il

3031 enclenche le début de la réaction.

	Volume µL par échantillon
Tampon triéthanolamine 0.05 M (pH=7.6)	100
D-glucose 0.555 M	100
MgCl ₂ 0.1 M	20
NADP ⁺ 0.014 M	20
G6PDH 125 U/mL	2
ATP 0.019 M	10

3032 <u>Tableau 9 : Mix réactionnel pour mesurer l'activité HK.</u>

3033

La lecture de l'absorbance est faite à 340nm au spectrofluorimètre (Infinite M200, TECAN)
préchauffé à la température de +37°C (±0,5°C) à raison d'une lecture toutes les 30 secondes
afin de suivre la réduction du NADP+ en NADPH.

3037 XV. Mesure d'activité protéase de NS3 du DENV

3038

La mesure de l'activité protéase a été réalisée à partir d'échantillons de cellules
électroporées sans ou avec du rSg. 40μL de lysats sont utilisés et placés sur une plaque 96
puits noirs à fond noir (Cell culture microplate, Greiner bio-one, référence 655086). 100μL
d'un tampon de mesure sont ajoutés par puits.

Ce tampon comprend : 50mM TrisHcl pH 8,5 (Trizma® hydrochloride, Sigma-Aldrich,
référence T5941) 20% glycérol (Euromedex, référence EU3550), 1mM CHAPS (SigmaAldrich, référence C5070) et 1mM du substrat AMC (Boc-Gly-Arg-Arg-AMC acetate salt,
Bachem, référence 4017086.0025).

3047 La lecture de la fluorescence est faite à 450nm au spectrofluorimètre (Infinite M200, TECAN)

3048 préchauffé à la température de $+37^{\circ}C$ ($\pm 0,5^{\circ}C$) à raison d'une lecture toutes les 30 secondes.

3049 L'objectif de ce dosage est d'évaluer l'interférence des protéines cellulaires HK2 et HK4 sur
3050 l'activité de NS3.

3051 Les résultats présentés ici correspondent à l'activité protéase spécifique de NS3 du DENV
3052 (différences entre les valeurs obtenues avec et sans réplicon) normalisée par le taux de

réplication de chaque type cellulaire obtenu afin d'éliminer le biais résultant de la différence
réplicative entre les homogénats considérés (HuH7 ou HuH7 HK4+ HK2-).

3056 XVI. Analyses statistiques

3057

La plupart des résultats de cette étude présentent une analyse comparative entre les cellules HuH7 et les cellules HuH7 HK4+ HK2-. Dans le cas où les moyennes de chaque type cellulaire pour un paramètre d'étude sont comparées, l'évaluation de la significativité de la différence observée est réalisée par t-test de Student. Ainsi, ont été considérées comme statistiquement significatives toutes les différences avec un risque α inférieur à 5% (une étoile), à 1% (deux étoiles) ou à 1‰ (trois étoiles).

Travaux réalisés

3064	L'équipe a développé la lignée cellulaire HuH7 HK4+ HK2- dérivée de la lignée	
3065	HuH7, (comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes » au paragraphe I-2) Création du	
3066	modèle cellulaire HuH7 HK4+ HK2-), et qui exprime HK4 au lieu d'HK2. Le métabolisme	
3067	de cette lignée a été extensivement étudié par l'équipe et a révélé que ce remplacement de	
3068	l'HK conduisait à une modification du transcriptome cellulaire et une réorganisation	
3069	importante du métabolisme central du carbone, réorientant certains flux métaboliques et	
3070	notamment le TCA, avec pour conséquence majeure le rétablissement de la lipogénèse et	
3071	l'accumulation de lipides intracellulaires dans ces cellules.	
3072	La première partie de mon projet de thèse, a été consacrée à la caractérisation de la réplication	
3073	du DENV-2 dans les cellules exprimant l'isoenzyme 4 d'HK (HK4 ou GCK) par rapport à	
3074	celles exprimant l'isoenzyme 2 (HK2).	
3075		
3076	I. L'isoenzyme d'HK exprimée par les cellules conditionne la	
3077	cinétique de l'infection des HuH7 par le DENV	
3078		
3079	1) Comparaison de la cinétique d'infection par le DENV dans les cellules	
3080	HuH7 et HuH7 HK4+ HK2-	
3081		
3082	Les deux types cellulaires HuH7 et HuH7 HK 4 + HK2, ont été infectés à une MOI de	
2002	0.1 Le séquence codente utilisée contient en amont du géneme viral une séquence codente	
3083	0,1. La sequence codante utilisée contient, en amont du genome viral, une sequence codante	
3084	pour la protéine rapportrice eGFP : ainsi, l'infection dans les cellules peut être suivie par	
3085	microscopie à fluorescence (figure 39).	



3086 <u>Figure 39</u>: Observation au microscope à fluorescence 72 heures post-infection de 3087 cellules infectées par le DENV à une MOI de 0,1.

Les cellules ont été infectées avec le virus DENV-eGFP comme décrit dans le « Matériels et méthodes ». Brièvement, les deux types cellulaires sont infectés à une MOI de 0,1 et observés postfixation à la PFA4% au microscope optique à fluorescence au grossissement x200. Les photographies de gauches sont obtenues à partir des cellules HuH7 et celles de droites pour les cellules HuH7 HK4+ HK2-.

3093

3094 Sur les images obtenues en lumière visible suite à l'infection DENV, on observe une 3095 différence de l'aspect du tapis infecté. 72 heures post-infection, les cellules HuH7 semblent 3096 confluentes et relativement bien étalées. A l'inverse, les cellules HuH7 HK4+ HK2-3097 apparaissent plus arrondies. Les images obtenues en microscopie à fluorescence indiquent que 3098 la proportion de cellules positives pour l'expression de la eGFP et donc répliquant activement 3099 le DENV, est plus importante pour les cellules HuH7 HK4+ HK2- que pour les cellules 3100 HuH7. Le virus DENV étant un virus cytopathique, l'aspect des tapis cellulaires peut 3101 s'expliquer par une plus forte infection dans les cellules exprimant l'HK4.

Ayant observé macroscopiquement des différences de confluence sur les tapis cellulaires
infectés, le nombre de cellules total dans chacun des puits infectés a été déterminé par
comptage. En figure 40 est représenté le nombre total de cellules par type cellulaire au cours
de la cinétique d'infection.



3106 <u>Figure 40 :</u> Nombre total de cellules dans les puits de culture 0, 24, 48 ou 72 heures post-3107 infection.

3108 La numération des cellules a été réalisée post-fixation PFA4% à 0, 24, 48 ou 72 heures post-infection.

3109 Les histogrammes représentent les moyennes de triplicats biologiques \pm erreurs standard.

3110 L'évaluation de la significativité est faite par un test t de Student, bilatéral, n.s.: non significatif.

3111

3112 On observe un nombre croissant de cellules au cours du temps pour les deux types 3113 cellulaires. Le nombre de cellules n'est pas statistiquement différent entre les deux types 3114 cellulaires étudiés. On observe une tendance à un ralentissement de la croissance cellulaire 3115 dans les cellules HuH7 HK4+ HK2- uniquement pour le temps 72 heures, révélant l'infection 3116 supérieure dans ces cellules.

3117

3118 Sur la base de la fluorescence de la eGFP, le nombre de cellules infectées dans chacun 3119 des modèles cellulaires a été analysé par cytométrie en flux (FACS) toutes les 24 heures à 3120 partir de l'infection pendant 4 jours. En **figure 41** est représentée l'évolution du nombre de 3121 cellules infectées au cours du temps en pourcentage de cellules infectées par rapport au 3122 nombre total de cellules.



3123 Figure 41 : Cinétique d'infection par le DENV des cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2-.

3124Le graphe montre l'évolution du pourcentage de cellules infectées en fonction du temps. Brièvement,3125les deux types cellulaires ont été infectés à une MOI de 0,1 puis trypsinés et analysés aux différents3126temps selon les méthodes décrites précédemment dans la partie « Matériels et méthodes ». Le3127pourcentage d'infection a été évalué par cytométrie en flux. Sont représentées les moyennes des3128pourcentages de cellules infectées \pm erreurs standard de trois expériences indépendantes sauf pour le3129temps 96 heures pour lequel une seule expérience a été réalisée. L'évaluation de la significativité est3130faite par un test t de Student, unilatéral, * : p < 5%.

3131

3132 A 24 heures post-infection, il n'y a pas de différence du pourcentage d'infection entre 3133 les HuH7 (1,15%) et HuH7 HK4+ HK2- (1,25%), l'infection étant alors très faible. A 48 et 72 3134 heures, l'infection devient plus élevée pour les HuH7 HK4+ HK2- que pour les cellules 3135 HuH7. A 96 heures, cette différence s'estompe : le taux d'infection atteint son maximum pour 3136 les cellules HuH7 HK4+ HK2- alors qu'il continue d'augmenter pour les HuH7. L'effet 3137 cytopathique de l'infection est alors observable dans les deux types cellulaires. 48 heures 3138 post-infection, le pourcentage d'infection atteint les 13,7% pour les HuH7 alors qu'il est de 3139 23,1% pour les HuH7 HK4+ HK2-. De manière similaire et évolutive, à 72 heures, 48,2% des 3140 HuH7 sont infectées et 83,5% des HuH7 HK4+ HK2- le sont. La différence entre les deux 3141 types cellulaires à 72 heures post-infection est statistiquement différente : p-value = 0,036.

Ces observations suggèrent soit que le DENV infecterait plus facilement les cellules HuH7
HK4+ HK2- que les cellules HuH7, soit que les cellules HuH7 HK4+ HK2- répliqueraient

3144 mieux le DENV, produiraient plus de particules infectieuses, et ainsi plus d'infections
3145 secondaires, que les HuH7.

3146 Le niveau de réplication dans chaque type cellulaire peut être observé par la 3147 quantification de l'intensité du signal de fluorescence de la eGFP dont le niveau d'expression 3148 dépend de la réplication du virus. L'intensité du signal FITC aux différents temps de cinétique 3149 a été analysée et représentée pour chaque type cellulaire sur la figure 42 (analyse réalisée à 3150 l'aide du logiciel FlowJO). Comme expliqué précédemment, la fusion du rapporteur eGFP avec la séquence complète du DENV permet le suivi de l'infection d'une cellule. Plus 3151 3152 l'intensité du signal FITC est élevée et plus une cellule est infectée. Afin de simplifier les 3153 lectures et de pouvoir comparer les deux types cellulaires, sont représentés les nombres de 3154 cellules normalisés en fonction de l'intensité de signal FITC, le nombre de cellules analysées 3155 variant d'un temps de lecture à l'autre ainsi que d'une expérience à l'autre.





3157 Les graphes représentent l'évolution du marquage FITC, suite à l'infection par le DENV, au cours du

3158 temps (24, 48 et 72 heures post-infection). Les cellules ont été infectées à une MOI de 0,1 et analysées

par FACS, à chaque temps de la cinétique, selon les méthodes décrites précédemment. Les profils
représentés sont issus d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes. Les profils

3161 *de gauche sont ceux obtenus avec les cellules HuH7, ceux de droite sont obtenus avec les cellules*

3162 *HuH7 HK4+ HK2-*.

24 heures post-infection, on observe que la distribution des populations de cellules 3164 infectées pour chaque type cellulaire se présente sous la forme d'un pic unique (que nous 3165 appellerons pic seuil par la suite) et dont les valeurs de fluorescence FITC vont de 0 à environ 3166 10³. Ces pics se superposent aux pics obtenus pour les cellules non-infectées (courbes grises) ; 3167 cela confirme que l'infection est faible et quasi indétectable à ce stade.

3168

A 48 heures post-infection, une population présentant une intensité de marquage FITC supérieure au pic seuil apparaît. Cette population correspond aux cellules infectées dont la proportion grandit. A ce temps de la cinétique, une légère différence entre les populations infectées d'HuH7 et d'HuH7 HK4+ HK2- commence à être observée.

Biologiquement cela veut dire, soit, que la majeure partie des cellules HuH7 ou HuH7 HK4+
HK2- n'est pas encore infectée soit que cette infection est trop faible pour être détectée. La
légère différence entre les deux types cellulaires traduit la différence de cinétique observée en **figure 41** et pourrait suggérer à ce stade une plus forte réplication dans les HuH7 HK4+ HK2-

3178 72 heures post-infection, un pic distinct d'intensité FITC importante $(10^4 \text{ à } 10^5)$ se 3179 détache du pic seuil. L'aire sous la courbe de ce pic est nettement supérieure pour les cellules 3180 HuH7 HK4+ HK2- que pour les cellules HuH7 indiquant un nombre de cellules infectées 3181 dans la culture inférieur dans ces dernières. Néanmoins, ce pic se trouve au même niveau 3182 d'intensité FITC pour les deux populations cellulaires indiquant ici un niveau d'expression de 3183 la protéine rapportrice eGFP identique lorsque la cellule est infectée, quel que soit le type 3184 cellulaire considéré.

La culture de cellules HuH7 HK4+ HK2- est donc à 72 heures, globalement, plus infectée par
le DENV que celle de cellules HuH7 mais avec la même quantité de eGFP pour les deux
types cellulaires.

3188

Cette analyse est complétée par la mesure du titre infectieux et de la quantité d'ARN viral présent dans les surnageants de culture à 72 heures post-infection. A ce temps, la différence d'infection observée entre les deux types cellulaires est la plus importante. Le titre infectieux extracellulaire est mesuré en nombre de foyer infectieux par mL de surnageant (**figure 43.A**). L'infectivité spécifique est représentée par le ratio entre la valeur du titre infectieux et le nombre de copies de génome du DENV mesuré dans les surnageants pour chaque type cellulaire (**figure 43.B**).



3196 <u>Figure 43 :</u> Titre infectieux et infectivité spécifique des particules virales dans les 3197 surnageants de chaque type cellulaire.

3198 Les cellules ont été infectées à une MOI de 0,1 et les surnageants de culture collectés 72 heures post-3199 infection. Ces surnageants ont été utilisés pour réaliser le titrage (FFU/mL) et l'ARN des surnageants 3200 a été extrait et analysé par RT-qPCR pour le DENV, comme décrit dans le « Matériels et méthodes ». 3201 Est représenté en (A) le titre infectieux extracellulaire en FFU/mL (normalisé par rapport au titre 3202 obtenu pour les HuH7) et en (B) l'infectivité spécifique correspondant au titre infectieux 3203 extracellulaire normalisé par le nombre de copie d'ARNs du génome du DENV. L'évaluation de la 3204 significativité est réalisée par un test t de Student, bilatéral, n.s.: non significatif, *: p<5%. Les 3205 barres d'erreurs correspondent aux erreurs standard.

3206

Le titre infectieux obtenu et présenté en **figure 43.A** est 1,6 fois supérieur pour les HuH7 HK4+ HK2- par rapport à celui obtenu pour les cellules HuH7. Ce résultat est en accord avec la plus forte infection observée en cellules HuH7 HK4+ HK2- et présenté en **figure 41**. L'infectivité spécifique mesurée pour les HuH7 HK4+ HK2- est quant à elle 2 fois supérieure à celle mesurée pour les HuH7 (**figure 43.B**). Même si cette différence n'est pas significative, la mesure de l'infectivité spécifique montre une tendance à être supérieure pour les cellules exprimant l'HK4 que pour celles exprimant HK2.

3214

L'ensemble de ces résultats montre que la cinétique d'infection des cellules HuH7
HK4+ HK2- est plus rapide que dans les cellules HuH7. Cette différence peut provenir d'une
réplication supérieure dans les cellules HuH7 HK4+ HK2- ou d'une production des particules

3218 infectieuses supérieure ou les deux. Il est impossible d'exclure ou de valider l'une de ces3219 hypothèses.

- 3220
- 3221
- 3222

2) Les cellules HuH7 HK4+ HK2- répliquent mieux le DENV que les cellules HuH7

3223

3224 Dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires pouvant être à 3225 l'origine d'une telle différence d'infection entre les deux types cellulaires, un second modèle 3226 infectieux du DENV a été utilisé. Il s'agit du modèle de rSg pour lequel, comme décrit dans le 3227 « Matériels et méthodes », le génome ne contient que les séquences codant les protéines NS 3228 du DENV couplé à un rapporteur rLuc. Ainsi, seules les étapes de réplication intracellulaire 3229 sont observées. Le génome utilisé ne comporte pas les séquences codantes pour les protéines 3230 d'enveloppe ou d'encapsidation et aucune infection secondaire, découlant d'un 3231 bourgeonnement et de néo-fusion de particules infectieuses complètes, n'est possible.

Ce génome ne pouvant produire des particules infectieuses, il est obligatoire de l'introduire de façon artificielle dans les cellules. Pour cela, les HuH7 et HuH7 HK4+ HK2- ont été électroporées avec l'ARN de ce réplicon préalablement transcrit *in-vitro* à partir d'un plasmide contenant l'ADNc du génome viral sous dépendance du promoteur SP6. Dans les cellules électroporées, il est ainsi possible de quantifier la réplication et traduction de l'ARN du rSg DENV grâce à la mesure de l'activité de la protéine rLuc qui est synthétisée suite à la traduction du génome viral et comme présenté en **figure 44**.



3239 Figure 44 : Réplication du rSg DENV dans les cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2-.

3240 Les cellules ont été électroporées avec lug d'ARN de rSg-DENV selon les méthodes préalablement 3241 décrites dans la partie « Matériels et méthodes ». (A) Luminescence rLuc mesurée dans chaque type 3242 cellulaire 24 et 48 heures post-électroporations et normalisée par les valeurs obtenues 4 heures post-3243 électroporation. Les mesures ont été réalisées comme indiqué dans le « Matériels et méthodes » au 3244 paragraphe « Analyse de la réplication en laboratoire de confinement de niveau 2». Le graphique 3245 représente les moyennes des réplicats d'une expérience \pm l'erreur standard. L'évaluation de la 3246 significativité est réalisée par un test t de Student, unilatéral, ***: p < 1%. (B) Western-blot 3247 d'expression de NS3 réalisé, comme décrit dans le « Matériels et méthodes », sur les lysats cellulaires 3248 obtenus à 4, 24 et 48 heures post-électroporation. L'actine est utilisée comme témoin de charge. L : 3249 ladder.

L'intensité de la luminescence (**figure 44.A**) a été mesurée 24 et 48 heures postélectroporation de l'ARN DENV. Une première mesure a été réalisée 4 heures postélectroporation afin de pouvoir normaliser les différences d'efficacité d'électroporation d'un type cellulaire à l'autre. A ce temps, seule la traduction des génomes introduits dans les cellules a eu lieu et on considère comme négligeable les cycles de réplication/traduction. Les valeurs de luminescence obtenues à 24 et 48 heures post-électroporation sont supérieures à celle du temps 4 heures indiquant la réplication efficace du génome viral.

3257 Dès 24 heures, les cellules HuH7 HK4+ HK2- répliquent mieux le virus que les cellules 3258 HuH7 (p-value de $2,5.10^{-5}$ à 24 heures et de $3,28 \times 10^{-5}$ à 48 heures). 48 heures post-3259 électroporation la différence entre les deux types cellulaires est supérieure et les HuH7 HK4+ 3260 HK2- présentent une valeur de RLU 1,7 fois plus importante que celles des HuH7. On 3261 observe donc une réplication DENV 1,7 fois plus importante dans les HuH7 HK4+ HK2- que
3262 dans les HuH7.

En figure 44.B, est présenté le western-blot d'expression de NS3 DENV dans les extraits cellulaires ayant servi à la mesure rLuc. A 4 heures post-électroporation, NS3 est indétectable. Dès 24 heures post-transfection, il y a détection de NS3 dans les lysats provenant de cellules HuH7 HK4+ HK2- alors que NS3 reste indétectable dans les cellules HuH7. 48 heures post-transfection, NS3 est détectable dans les deux types cellulaires et est plus importante dans les cellules HuH7 HK4+ HK2- que dans les lysats de cellules HuH7.

- La différence de luminescence observée entre les cellules HK4+ HK2- et les cellules HuH7
 ne peut donc pas être attribuable à une simple stabilisation de la protéine rLuc dans les
 cellules exprimant HK4 mais est bien le résultat d'une meilleure réplication/traduction du
- 3272 génome viral comme l'atteste l'expression supérieure de NS3.
- 3273

Les précédents résultats montrent que les cellules exprimant HK4 répliquent mieux le DENV.
Le fait que la réplication soit supérieure montre que même si la nature des particules virales
sécrétées par les cellules HuH7 HK4+ HK2- est la même que celles des cellules HuH7 (figure

43.B), leur quantité sécrétée est supérieure (figure 43.A). Le niveau d'expression des HKs

entre les deux types cellulaires n'étant pas le même, l'impact direct du niveau d'expression
d'HK4 a donc été analysé sur la réplication du DENV.

3280 Pour cela, différentes lignées cellulaires ont été générées, exprimant différents niveaux
3281 d'HK4.

3282 En figure 45, est présentée l'activité de la rLuc mesurée 48 heures post-électroporation, dans

3283 différentes lignées de cellules transduites à des MOI croissantes pour l'expression d'HK4.

3284 Les cellules obtenues expriment toujours HK2 sauf pour les HuH7 HK4+ HK2-.



3285 Figure 45 : Réplication du rSg DENV en fonction de la quantité d'HK4 exprimée.

3286 Les différents types cellulaires ont été générés par transduction de cellules HuH7 pour l'expression 3287 d'HK4 à différentes MOI (HuH7 HK4+ MOI 10 ; 100 ou 1500). L'HK2 a été supprimée des cellules 3288 HuH7 HK4+ transduites à une MOI de 1 500 comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». 3289 (A) Western-blot d'expression d'HK2 et d'HK4 réalisé sur les lysats cellulaires totaux. (B) Niveaux de 3290 réplication mesurés dans chaque type cellulaire 48 heures post-électroporations. Les résultats de 3291 luminescence obtenus ont été normalisés comme indiqué en figure 44 pour chaque type cellulaire et 3292 rapportés aux cellules HuH7. Le graphique représente les moyennes de trois expériences 3293 indépendantes ± erreurs standard. L'évaluation de la significativité entre un type cellulaire et les 3294 cellules HuH7 ainsi qu'entre les cellules HuH7 HK4+ MOI 1 500 et les cellules HuH7 HK4+ HK2- a 3295 été réalisée par un test ANOVA One-way sur mesures répétées dont la p-value est de 0,0028.

3296 Les niveaux d'expression d'HK2 et d'HK4 ont tout d'abord été vérifiés par westernblot (figure 45.A). Le poids moléculaire de la protéine HK4 est d'environ 50 kDa, alors que 3297 3298 le poids moléculaire de la protéine HK2 est de 100 kDa. L'actine, de 42 kDa, sert de témoin 3299 de charge. Sur le western-blot HK2, les pistes chargées en lysats issus de cellules exprimant 3300 HK2 présentent une bande de même intensité. Au contraire, sur la piste correspondant aux 3301 lysats de cellules HuH7 HK4+ HK2-, la bande n'est plus présente confirmant donc bien 3302 l'absence d'expression d'HK2 dans ces cellules. Comme attendu, l'expression d'HK4 est 3303 proportionnelle à la MOI de transduction des cellules et l'on observe bien l'absence 3304 d'expression d'HK4 dans la piste correspondant aux cellules HuH7.

3305 Ces différentes lignées cellulaires ont donc été utilisées pour l'électroporation du réplicon 3306 DENV. Comme précédemment, la luminescence de la rLuc est représentée en fold du temps 4 3307 heures et la moyenne des intensités mesurées pour les HuH7 a arbitrairement été fixée à 1 3308 pour normaliser la réplication dans chaque type cellulaire par rapport aux HuH7. Les résultats 3309 de luminescence obtenus 48 heures post-électroporation indiquent que plus la quantité d'HK4 3310 exprimée par une cellule est importante, plus la réplication virale est importante (figure 3311 45.B). Cette augmentation de la réplication est statistiquement vraie dès une MOI de 3312 transduction pour HK4 de 10. Ces résultats indiquent également que la perte d'expression 3313 d'HK2 n'a pas de conséquence sur la réplication de DENV puisque la luminescence rLuc 3314 dans les cellules HuH7 HK4+ HK2- n'est pas statistiquement différente des cellules HuH7 3315 HK4+ HK2+ (c'est-à-dire les cellules HuH7 ayant été transduites pour l'expression d'HK4 3316 MOI de 1500 mais non invalidées pour HK2 par CRISPR/Cas9).

Ainsi, plus une cellule exprime HK4 et plus le DENV se réplique dans ces cellules et ce, de
façon dose dépendante. L'expression ou non d'HK2 dans les cellules HuH7 n'a pas de
conséquence sur la réplication DENV.

3320

Afin de s'assurer que cette observation n'était pas simplement liée à la surexpression d'une HK, des cellules HuH7 ont donc été transduites pour surexprimer stablement HK2 avec un lentivirus à une MOI de 1500. La lignée HuH7 HK2+ obtenue surexprime donc une autre isoforme d'HK que les cellules HuH7 HK4+ HK2- mais en quantité importante et équivalente (résultats validés par qPCR et non présentés ici). Ces cellules ont ensuite été électroporées avec du rSg et la mesure de la luminescence rLuc a été mesurée de la même façon 48 heures post-électroporation. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 46**.



3328 Figure 46 : Effets de la surexpression d'HK2 sur la réplication du rSg et l'activité HK.

3329 (A) Western-blot d'expression de HK2 et HK4 dans les lignées HuH7, HuH7 HK2+ et HuH7 HK4+ 3330 HK2-. Le détail des conditions expérimentales est précisé dans la section « Matériels et 3331 méthodes ». (B) Luminescence rLuc mesurée selon les méthodes préalablement décrites. L'évaluation 3332 de la significativité entre un type cellulaire et les cellules HuH7 est réalisée par un test t de Student, 3333 bilatéral, n.s. : non significatif, ** : p < 1%. Les histogrammes représentent les moyennes de trois 3334 expériences indépendantes ± erreurs standard. (C) Activité HK mesurée, selon le protocole décrit 3335 dans le « Matériels et méthodes », dans les lysats de cellules HuH7, HuH7 HK2+ ou HuH7 HK4+ 3336 *HK2-.* Sont représentées les moyennes de réplicats d'une expérience \pm erreurs standard L'évaluation 3337 de la significativité entre un type cellulaire et les cellules HuH7 est réalisée par un test t de Student, 3338 *bilatéral, *** : p<1‰*.

3339 En figure 46.A, le western-blot permet de vérifier l'efficacité de transduction des 3340 cellules et d'observer l'augmentation du niveau d'expression d'HK2 et d'HK4 dans les 3341 cellules HuH7 HK2+ et HuH7 HK4+ HK2- respectivement. A nouveau, l'actine sert de 3342 témoin de charge. Comme attendu, les cellules HuH7 HK2+ expriment plus de protéine HK2 3343 que les HuH7. Les HuH7 HK4+ HK2- expriment HK4 mais pas HK2. En figure 46.C, 3344 l'activité HK totale mesurée dans des cellules HuH7 transduites pour HK2 à la MOI de 1 500 3345 (HuH7 HK2+) est identique à celle des cellules HuH7 HK4+ HK2-, toutes deux étant 3346 significativement plus élevées que l'activité mesurée dans des cellules HuH7 (p-value de 2,34 x 10^{-5} et 1.21 x 10^{-6} pour les cellules transduites HK2 ou HK4 respectivement). Ces deux 3347 lignées (HuH7 HK2+ et HuH7 HK4+ HK2-) sont donc comparables quant à la quantité 3348 3349 d'activité HK mesurée dans des lysats cellulaires mais expriment soit HK2 soit HK4. En 3350 figure 46.B, sont présentées les valeurs de rLuc obtenues 48 heures après électroporation du 3351 rSg. Les cellules HuH7 HK4+ HK2- ont une moyenne de luminescence significativement plus 3352 élevée que celle des HuH7 (p-value = 0.0025) indiguant la plus forte réplication dans ces 3353 cellules et comme observé précédemment. En revanche, la réplication dans les cellules HuH7 3354 HK2+ n'est pas différente de celle observée dans les cellules HuH7 (p-value = 0,48). Ceci 3355 suggère un effet spécifique de la protéine HK4 mais qui ne serait pas forcément corrélé à la 3356 quantité absolue d'activité HK mesurée dans les cellules.

3357

Ces résultats montrent donc que le fait de surexprimer une HK dans les cellules HuH7 n'est pas suffisant pour induire une meilleure réplication du DENV et que HK4 est nécessaire et suffisante pour permettre une meilleure réplication.

3361

33623363

II. L'infection par le DENV induit une augmentation de la consommation de glucose cellulaire

3364

Comme abordé dans l'introduction de ce manuscrit, plusieurs travaux ont montré l'impact de l'infection par le DENV sur le métabolisme de différents types cellulaires. Une publication rapporte l'effet positif de l'infection sur la consommation de glucose de cellules fibroblastiques (Fontaine et al., 2015). Nous nous sommes donc interrogés sur les conséquences métaboliques de l'infection sur la lignée hépatocytaire HuH7 et sur le modèle HuH7 HK4+ HK2-.

- 3371 En figure 47 est représentée la consommation de glucose suite à une infection par le DENV
- 3372 (A) et une transfection du rSg (B).



3373 <u>Figure 47 :</u> Effet du DENV sur la consommation de glucose des cellules HuH7 et HuH7
3374 HK4+ HK2-.

3375 (A) Effet de l'infection par le DENV sur la consommation de glucose en cellules HuH7 et en cellules 3376 HuH7 HK4+ HK2-. Brièvement, les cellules ont été infectées comme décrit dans la partie « Matériels 3377 et méthodes » à une MOI de 0,1. Les surnageants ont été récoltés 72 heures post-infection et la 3378 quantité de glucose résiduelle mesurée. La consommation est calculée par rapport à la quantité 3379 initiale de glucose présente dans le puits de culture. Les résultats sont exprimés par rapport aux 3380 valeurs obtenues pour les cellules HuH7 non infectées. (B) Effet de la réplication du rSg DENV sur la 3381 consommation de glucose en cellules HuH7 et en cellules HuH7 HK4+ HK2-. Les cellules ont été 3382 électroporées comme précédemment. De la même façon qu'en (A), les surnageants ont été récoltés, 72 3383 heures post-électroporation, et les consommations de glucose calculées. Les résultats sont exprimés 3384 par rapport aux valeurs obtenues pour des cellules HuH7. Sont représentées les moyennes de trois 3385 expériences indépendantes \pm erreurs standard. n.s. : non significatif, ** : p < 1%, *** : p < 1% d'après 3386 un test de Student.

3387

Que ce soit pour l'infection par le virus entier ou la transfection du réplicon, la consommation de glucose des cellules répliquant le virus a été comparée à celle de cellules non infectées, traitées dans les mêmes conditions et dont la consommation a été arbitrairement fixée à 1. L'infection DENV dans les cellules HuH7 augmente la consommation de glucose de 1,26 fois (**figure 47.A**). Cette observation est cohérente avec les travaux de Fontaine et al., rapportant une augmentation de la consommation de glucose du même ordre dans des 3394 fibroblastes (Fontaine et al., 2015). En revanche cette consommation apparait 2,2 fois 3395 supérieure dans des cellules HuH7 HK4+ HK2- infectées par rapport aux mêmes cellules non 3396 infectées. Il serait tentant de conclure que la surconsommation de glucose est plus importante 3397 pour les cellules HuH7 HK4+ HK2- mais comme démontré précédemment, le niveau 3398 d'infection des cellules exprimant l'HK4 est plus important que celui des cellules exprimant 3399 HK2. Lorsque ces résultats sont rapportés aux pourcentages d'infection respectifs de chaque 3400 modèle cellulaire (17% pour les HuH7 versus 72% pour les HuH7 HK4+ HK2- ici à 72 3401 heures post-infection), l'augmentation de la consommation de glucose réelle est donc de 26% 3402 pour 17% de cellules HuH7 infectées. Si 72% des cellules HuH7 étaient infectées, comme le 3403 sont les cellules HuH7 HK4+ HK2-, l'augmentation estimée serait de 110% (= (72/17) x 3404 26%) soit 2,2 fois la consommation de glucose des cellules non infectées. Cette augmentation 3405 est exactement la valeur de surconsommation de glucose obtenue pour les cellules HuH7 3406 HK4+ HK2- infectées.

L'infection avec le virus DENV entier induit donc une augmentation significative de laconsommation de glucose et de façon identique dans les deux types cellulaires.

3409

Pour l'évaluation de la consommation de glucose suite à l'électroporation du réplicon
(figure 47.B), les valeurs sont également normalisées par rapport aux cellules HuH7 non
infectées.

Comme observé lors de l'infection avec le virus, il y a surconsommation de glucose pour les 3413 3414 cellules répliquant le DENV. La consommation est augmentée de 1,91 fois dans les cellules 3415 HuH7 (p-value = 0,0001) et de 1,94 fois dans les cellules HuH7 HK4+ HK2- (consommation 3416 de glucose passant de 2,24 à 4,34). Ici encore l'augmentation de la consommation de glucose 3417 est observée de façon identique entre les deux types cellulaires. Cette augmentation est 3418 globalement supérieure à celle observée pour les cellules infectées avec le virus mais la 3419 quantité de génomes présente dans les cellules au moment de l'électroporation est sans doute 3420 différente de celle introduite par l'infection et pourrait ainsi expliquer la différence 3421 d'induction de consommation entre les deux système d'infection virale.

En conclusion, quel que soit le modèle infectieux utilisé, la réplication du DENV augmente
de façon significative la consommation de glucose dans les lignées hépatocytaires, mais de
façon similaire pour les cellules HuH7 ou HuH7 HK4+ HK2-.

3425

3426 L'entrée du glucose dans les cellules est permise par l'action des transporteurs
3427 GLUTs. La différence de consommation de glucose basale observée entre les cellules

exprimant HK2 ou HK4, ainsi que l'induction de cette consommation lors de l'infection par le
DENV, pourrait s'expliquer par une augmentation de l'expression de ces transporteurs. Leur
expression relative dans les deux modèles cellulaires ainsi que l'influence du DENV sur leur
niveau d'expression a été analysée par Western-Blotting et les résultats sont présentés en
figure 48.



3433 <u>Figure 48</u>: Expression des protéines GLUTs dans les différents modèles d'étude

3434 électroporés ou non avec le rSg du DENV.

- 3435 Western-blot d'expression des protéines GLUT1, 2, 3, 4 et 5 dans des lysats de cellules HepaRG,
- 3436 HuH7 ou HuH7 HK4+ HK2- électroporées ou non avec du rSg de DENV comme préalablement
- 3437 décrit. Les différents anticorps utilisés pour la révélation sont précisés dans le tableau récapitulatif
- 3438 présenté dans la partie « Matériels et méthodes ». L'expression d'actine sert de témoin de charge.

3439 Les cellules HepaRG sont une lignée de cellules capables de se différencier en cellules 3440 biliaires ou hépatocytaires. Elles constituent le contrôle positif d'expression de l'ensemble des 3441 transporteurs GLUTs. Quel que soit le type de GLUT testé, le taux d'expression de ces protéines est élevé dans ces cellules. Pour ce qui est des autres modèles cellulaires (HuH7 et 3442 3443 HuH7 HK4+ HK2-), en comparant par rapport au taux d'expression de l'actine et des HepaRG, le taux d'expression des GLUTs est relativement faible et aucune différence 3444 3445 d'expression majeure n'a été observée hormis peut-être GLUT 3. Dans tous les cas, il n'y a 3446 pas de conséquence de l'infection DENV sur le niveau d'expression des différentes protéines 3447 GLUTs. L'induction de consommation de glucose observée lors de l'infection ne peut donc 3448 pas être expliquée par une induction d'expression des transporteurs GLUTs lors de cette 3449 infection.

3450

Afin de déterminer l'importance du métabolite du glucose pour la réplication du DENV, des expériences ont été menées en modifiant la composition du milieu de culture des cellules électroporées avec du rSg. L'effet sur la réplication a été évalué à 48 heures postélectroporation, via la mesure du signal rLuc.

Pour cela, le glucose a été remplacé par du galactose à la même concentration (25mM).

Le galactose est un métabolite pouvant alimenter la voie de la glycolyse via sa conversion en glucose-1-phosphate par la galactose-1-phosphate uridyltransférase puis en glucose-6phosphate par la phosphoglucomutase, métabolite qui pourra entrer dans la glycolyse. Son utilisation permet donc de shunter la première étape de la glycolyse : la transformation du glucose en glucose-6-phosphate sous l'action de l'HK.

Les cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2- ont donc été électroporées dans les mêmes conditions et ensemencées avant une première lecture classique de luminescence à 4 heures post-électroporation. Ce n'est qu'à ce moment-là qu'une partie des cellules a été soumise à un milieu contenant du glucose ou contenant du galactose. Les résultats sur la réplication du DENV mesurée après 48 heures d'incubation sont présentés en **figure 49**.



3466 <u>Figure 49:</u> Réplication du rSg DENV dans un milieu contenant du glucose ou du 3467 galactose.

3468Les cellules sont électroporées comme préalablement décrit. 4 heures post-électroporation, les milieux3469de cultures sont changés pour des milieux à 25mM de glucose ou de galactose. (A) Luminescence3470rLuc obtenue 48 heures post-électroporation et normalisée par rapport au temps 4 heures. Moyennes3471de deux expériences \pm écarts types. (B) Consommation de glucose des cellules HuH7 ou HuH7 HK4+3472HK2- 48 heures post-électroporation, mesurée comme décrit pour la figure 47. L'évaluation de la3473significativité entre les cellules incubées avec du glucose ou du galactose est réalisée par un test t de3474Student, bilatéral, * : p<5%, *** : p<1‰.</td>

3475

Quel que soit le type cellulaire, le remplacement du glucose par du galactose a tendance à diminuer la luminescence et donc la réplication du DENV (**figure 49.A**). Cette diminution est uniquement significative pour les cellules HuH7 HK4+ HK2- (p-value égale à 0,03) suggérant une plus forte dépendance de la réplication virale au glucose dans ce type cellulaire.

En **figure 49.B**, comme attendu, la consommation de glucose est nulle lorsque le milieu ne contient plus que du galactose. Pour autant, aucune mortalité cellulaire n'a été observée en présence de galactose et quel que soit le type cellulaire considéré, indiquant la capacité des cellules à survivre dans un milieu sans glucose.

Ainsi, les résultats montrent d'une part l'importance de la source de sucres pour la réplication
virale et d'autre part, que l'augmentation de la réplication observée dans les cellules
exprimant HK4 est dépendante de cette première étape de phosphorylation du glucose par
l'HK4.

3489 Comme expliqué en introduction, il a été montré dans la littérature que le DENV a une 3490 réplication étroitement liée au métabolisme lipidique. Ainsi Sigueira et al., ont montré que le 3491 virus favoriserait la lipogénèse et utiliserait ensuite les acides gras produits comme source 3492 d'énergie par lipolyse (Fernandes-Siqueira et al., 2018). L'analyse du métabolisme des 3493 cellules HuH7 HK4+ HK2- a révélé qu'elles possédaient une lipogénèse restaurée par rapport 3494 aux cellules HuH7. Afin de déterminer si l'augmentation de la réplication du DENV observée 3495 dans les cellules HuH7 HK4+HK2- pouvait être expliquée par une augmentation de la 3496 lipogénèse dans ces cellules induite par l'infection, nous avons analysé l'effet de l'infection 3497 par le DENV sur la quantité de triglycérides (TGs) intracellulaires et sur l'activité HK (figure 3498 **50**).



3499 <u>Figure 50 :</u> Effet de la réplication du rSg DENV sur la quantité de TGs et l'activité HK 3500 en cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2-.

Les cellules ont été électroporées avec (+) ou sans (-) l'ARN de rSg de DENV et traitées comme décrit
préalablement. (A) Quantité de TGs intracellulaires mesurée 72 heures post-électroporation. Les
résultats sont normalisés par million de cellules et rapportés aux cellules sans réplicon (B) Activité
HK mesurée dans les lysats de cellules HuH7 ou HuH7 HK4+ HK2-, 48 heures post-électroporation.

3505 Sont présentées les moyennes de trois expériences indépendantes ± erreurs standard. L'évaluation de

3506 la significativité entre les cellules électroporées avec et sans réplicon est réalisée par un test t de

- 3507 Student, unilatéral, n.s : non significatif, * : p < 5%.
- 3508

On observe en **figure 50.A**, que l'électroporation du rSg DENV semble diminuer la quantité de lipides intracellulaires et ce de façon significative pour les cellules HuH7 HK4+ HK2- (p-value = 0,018). Néanmoins la différence observée est faible et du même ordre quel que soit le type cellulaire considéré. Ces données sont cohérentes avec l'induction de lipolyse induite par le virus et qui a été rapportée par Heaton et al. (Heaton and Randall, 2010). La significativité évaluée pour les cellules HuH7 HK4+HK2- n'est portée que par un écart-type à la moyenne plus faible que celui observé pour les cellules HuH7. Il nous est donc difficile de conclure quant à l'induction supérieure de lipolyse par le DENV dans les cellules exprimant HK4.

3518 En terme d'activité HK (figure 50.B), le virus DENV ne semble pas moduler l'activité de
3519 l'enzyme et cela quel que soit l'isoenzyme considéré.

3520

La réplication DENV dans les cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2- semble donc dépendre, du moins en partie, des lipides intracellulaires mais cela, pour les deux types cellulaires et de façon indépendante de l'activité kinase de l'HK.

3524

3525 La réplication du DENV est associée au métabolisme lipidique et les cellules HuH7 3526 HK4+ HK2- possédant un contenu en lipides plus important que les cellules HuH7, nous 3527 avons donc voulu évaluer si la simple présence de quantités supérieures de gouttelettes 3528 lipidiques dans ces cellules pouvait expliquer la meilleure réplication du virus (figure 51). 3529 Les cellules ont donc été traitées avec de l'acide oléique (acide gras mono-insaturé qui 3530 constitue avec le palmitate l'acide gras le plus rencontré dans les régimes alimentaires 3531 occidentaux), afin d'augmenter les gouttelettes lipidiques intracellulaires. Dans l'hépatocyte, 3532 ces acides gras sont connus pour être responsables d'une accumulation de gras pouvant 3533 aboutir à une stéatose (Ricchi et al., 2009).



3534 <u>Figure 51 :</u> Effet du traitement à l'acide oléique sur le contenu en lipides neutres des 3535 cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2- et sur la réplication du rSg DENV.

(A) Quantité de lipides neutres intracellulaires après marquage Bodipy[®] (sonde fluorescente 3536 3537 spécifique des lipides neutres intracellulaires) comme décrit dans le « Matériels et méthodes »,24 3538 heures post-traitement à l'acide oléique. Brièvement, 4 heures post-ensemencement, les milieux de 3539 cultures sont changés pour des milieux avec ou sans acide oléique à 250µM final puis les cellules incubées 24 heures avant marquage au Bodipy[®] et analyse par cytométrie de flux. Les résultats sont 3540 3541 rapportés aux cellules HuH7. Sont présentées les moyennes ± erreurs standard de réplicat 3542 expérimentaux obtenus pour une expérience. (B) Luminescence rLuc mesurée pour chaque type 3543 cellulaire 48 heures post-électroporation. 4 heures post-électroporation, les milieux de cultures sont 3544 changés pour des milieux avec ou sans acide oléique à 250µM puis les cellules incubées 44 heures. 3545 Sont présentées les moyennes de trois expériences réalisées indépendamment ± erreurs standard.

3546L'évaluation de la significativité entre un type cellulaire et les cellules HuH7 (A) ou bien des cellules3547traitées ou non avec de l'acide oléique (B) est réalisée par un test t de Student, unilatéral, n.s : non3548significatif, * : p < 5%, ** : p < 1%.

3549

En **figure 51.A**, l'incubation des cellules avec 250μ M d'acide oléique augmente la quantité de lipides neutres intracellulaires après marquage Bodipy. L'acide oléique augmente de façon significative la quantité de lipides neutres dans les cellules HuH7 (p-value = 0,006) mais pas dans les cellules HuH7 HK4+ HK2- même si une tendance à l'augmentation de la quantité de lipides est observée. En revanche, comme préalablement décrit par l'équipe, les cellules HuH7 HK4+ HK2- présentent plus de lipides que les cellules HuH7. Il en est de même pour les cellules HuH7 HK4+ HK2- traitées à l'acide oléique (p-value = 0,032). En **figure 51.B**, est présenté l'effet du même traitement à l'acide oléique sur la réplication DENV. Comme préalablement décrit, les cellules HuH7 HK4+ HK2- répliquent mieux le DENV que les cellules HuH7 (p-value = 0,012), mais le traitement à l'acide oléique n'a aucune conséquence sur la réplication virale. Ainsi l'augmentation de lipides intracellulaires induite par l'acide oléique ne semble pas avoir d'effet sur la réplication virale.



3562 <u>Figure 52</u>: Effet du traitement palmitate sur la réplication rSg DENV en cellules HuH7
3563 et HuH7 HK4+ HK2-.

3564Luminescence rLuc mesurée pour chaque type cellulaire 48 heures post-électroporation. Comme3565précisé en figure 51, 4 heures post-électroporation, les milieux de cultures sont changés pour des3566milieux avec ou sans palmitate à $100\mu M$ puis les cellules incubées 48 heures avant lecture de la3567luminescence. Sont représentées les moyennes de luminescence obtenues pour deux expériences3568indépendantes \pm erreurs standard.

3569 L'évaluation de la significativité entre des cellules traitées ou non au palmitate pour un type cellulaire
3570 donné est réalisée par un test t de Student, bilatéral, n.s. : non significatif.

3571

3572 Afin d'évaluer si un autre acide gras que l'acide oléique pouvait avoir un impact sur la 3573 réplication virale, les cellules ont été traitées dans les mêmes condition avec 100µM d'acide 3574 palmitique (concentration non toxique pour les cellules mais augmentant la quantité de lipides neutres intracellulaires après marquage au Bodipy[®], résultats non présentés ici). Sur la **figure** 3575 3576 52 est présenté l'effet de ce traitement des cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2- sur la 3577 réplication du rSg DENV. Comme observé lors du traitement par l'acide oléique, le palmitate 3578 n'a aucun effet sur la réplication virale bien que les cellules HuH7 HK4+ HK2- répliquent 3579 mieux le DENV que les HuH7 (p-value = 0,005).

Le traitement avec des acides gras (acides oléique et palmitique) ne semble pas être suffisant pour augmenter la réplication DENV. Ainsi, l'augmentation de la quantité de gouttelettes lipidiques dans les cellules HuH7 ou HuH7 HK4+ HK2- ne semble pas suffisante pour expliquer la meilleure réplication du virus dans les cellules HuH7 HK4+ HK2 qui ont intrinsèquement un contenu en lipide neutre supérieur.

3585 III. Interaction de NS3 avec les HKs et effet de NS3 sur le métabolisme 3586 cellulaire

3587

D'après les résultats précédents, les cellules exprimant l'HK4 sont plus aptes à répliquer le DENV et l'activité HK semble être impliquée dans ce phénomène. L'utilisation du système réplicon exclut la possibilité que les mécanismes moléculaires sous-jacents impliquent les protéines structurales qui sont absentes dans ce système. Nous avons donc étudié si l'une des protéines virales NS pouvait être à l'origine des modifications métaboliques observées lors de l'infection et pouvait expliquer la différence de réplication entre les cellules exprimant HK2 ou HK4.

3595

Comme évoqué en introduction dans le chapitre 4, les données de la littérature et de l'équipe à l'origine de ce projet de thèse, ont permis de mettre en évidence que les protéines NS du DENV interagissent avec un grand nombre de protéines humaines impliquées notamment dans l'immunité, le transport intracellulaire, la transduction ou encore le métabolisme. Parmi elles, la protéine NS3 a été identifiée comme interagissant avec un grand nombre de protéines humaines (après NS1 et NS5) et était la seconde protéine plus étudiée (après NS1).

3603 De plus, quelques travaux démontrent une implication de la protéine NS3 dans une 3604 réorientation du métabolisme cellulaire favorable pour la réplication virale. L'équipe de 3605 Randall G. a démontré en 2010 que la protéine NS3 était capable d'interagir et de relocaliser 3606 la protéine responsable de la synthèse des acides gras au niveau des sites de réplication du 3607 DENV situés au niveau de la membrane du RER facilitant ainsi la réplication virale (Heaton 3608 et al., 2010). Au commencement de ce projet, quelques données de la littérature indiquaient 3609 ou suggéraient que le DENV modifiait la glycolyse cellulaire (Fontaine et al., 2015). L'équipe venait alors d'identifier pour HCV une interaction entre la protéine NS5A et l'HK2 3610 3611 expliquant l'activation de cette enzyme lors de l'infection. Ce contexte de recherche au sein de notre équipe nous a conduits à rechercher si les protéines NS du DENV étaient capables
d'interagir avec des enzymes du métabolisme central du carbone et ainsi expliquer les
modulations de la glycolyse précédemment rapportées ou la différence de réplication
observée entre les HuH7 et HuH7 HK4+ HK2-.

3616 Ainsi, afin de déchiffrer plus précisément les mécanismes moléculaires à l'origine d'une telle
3617 différence de réplication du DENV entre les deux types cellulaires, un premier crible
3618 d'interaction entre la protéine NS3 et les protéines humaines du métabolisme a été réalisé.

- 3619
- 3620 3621

1) L'interaction de NS3 avec les HKs cellulaires

3622 Un test de complémentation protéique (PCA, Protein Complementation Assay) testant l'interaction entre la protéine NS3 sous forme entière et de nombreuses enzymes 3623 3624 métaboliques humaines a été réalisé par l'équipe. Brièvement, des cellules HEK293T sont 3625 transfectées avec un plasmide permettant l'expression de la protéine NS3 en fusion avec une 3626 moitié de Gaussia Luciférase (GLuc) et un plasmide permettant l'expression d'un potentiel 3627 interactant cellulaire en fusion avec la seconde moitié de la GLuc. Un set de protéines de la 3628 glycolyse a été sélectionné pour tester son interaction avec NS3. Les résultats sont présentés 3629 figure 53 où chaque histogramme représente l'intensité de signal résultant de l'interaction 3630 testée avec un partenaire cellulaire. Les protéines du métabolisme testées sont indiquées en 3631 abscisse. Les valeurs de luminescence obtenues ont été normalisées par un contrôle négatif 3632 d'interaction constitué par deux protéines connues pour ne pas interagir l'une avec l'autre, et 3633 ainsi ne pas reconstituer de protéine GLuc entière capable d'émettre de la luminescence après 3634 mise en contact avec son substrat (figure 53).



3635 <u>Figure 53</u>: Crible d'interaction de NS3 DENV avec des protéines du métabolisme
 3636 cellulaire.

Résultats obtenus par expérience de complémentation protéique. Brièvement, des cellules HEK293T
sont transfectées pour l'expression de la protéine NS3 fusionnée à une moitié de GLuc et d'une
protéine cellulaire fusionnée avec l'autre moitié de la GLuc. 24 heures post-transfection l'intensité de
luminescence résultant de l'éventuelle interaction a été mesurée à l'aide d'un luminomètre comme
décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le graphique représente les moyennes de trois
expériences d'interactions ± écart types. Les histogrammes rouges indiquent des interactions
fortement positives (avec HK2 et HK3).

3644

Cette méthode de criblage indique que deux protéines interagissent fortement avec la protéine NS3 du DENV : HK2 et HK3 (**figure 53**). Globalement, les signaux mesurés pour l'ensemble des combinaisons entre NS3 et les différentes protéines cellulaires sont élevés mais les NLR calculés qui sont en moyenne de 10 sur ce set d'interactions testées, est de 60 et 32 respectivement pour HK2 et HK3. Il s'agit des deux plus forts signaux pour l'ensemble des interactions testées et il s'agit de deux isoenzymes suggérant qu'il s'agit d'une interaction potentiellement fonctionnelle.

3652

Bien entendu, afin de confirmer et d'affiner la caractérisation de l'interaction de NS3 avec les HKs, deux autres tests d'interaction ont été réalisés à partir de cellules HEK293T transfectées pour l'expression d'HK2 ou HK4 avec NS3 soit sous forme entière (résultats obtenus par co-immunoprécipitation et *nanoluciferase two hybrids*, **figures 54.A** et **54.B**) soit 3657 ses sous-domaines protéase et hélicase (résultats obtenus par *nanoluciferase two*3658 *hybrids*, figure 54.B).





3660 (A) Coimmunoprécipitation (CoIP) entre la protéine NS3 entière du DENV et les HKs. Les cellules
3661 HEK293T ont été transfectées pour l'expression des HKs ou GLUD2 (ici utilisé comme contrôle
a662 négatif d'interaction) et/ou la protéine DENV NS3 entière flaguée. 48 heures post-transfection, les
3663 cellules sont lysées et la NS3 immunoprécipitée à l'aide de billes anti-flag. Le contenu protéique des
3664 lysats ainsi que des produits d'immunoprécipitation sont analysés par western-blotting. (B)
3665 Luminescence GLuc obtenue par complémentation de la nanoluciférase (N2H) en cellules HEK293T
3666 transfectées pour l'expression de la protéine NS3 (entière ou ses sous-domaines) et la protéine HK2

3667 ou HK4. La technique N2H est présentée en détail dans la partie « Matériels et méthodes ». Les
3668 graphiques présentent ici les moyennes de luminescence obtenues par trois expériences indépendantes
3669 ± écarts types pour la combinaison de fusion de la nanoluciférase en N terminal pour les protéines
3670 virales et en C terminal pour les HKs. Le seuil de positivité d'interaction matérialisé par une ligne
3671 discontinue est fixé par la somme de luminescence obtenue en absence de l'un des partenaires.

3672

3673 En figure 54.A sont présentés les résultats du western-blot de la coIP. : La détection 3674 des HK1, 2, 3, 4 ou du contrôle GLUD2 et de NS3 dans les lysats totaux permet de s'assurer 3675 de la bonne expression des différents partenaires d'interaction. Sur les western-blots réalisés 3676 sur les produits d'immunoprecipitation, on observe des bandes spécifiques après révélation 3677 avec un anti-flag, pour l'ensemble des conditions testées (HK1, 2, 3, 4 et GLUD2) attestant de 3678 l'efficacité de l'immunoprécipitation. On révèle les 4 isoenzymes d'HK dans ces produits 3679 mais pas la protéine GLUD2, confirmant ainsi l'interaction entre NS3 et les HKs. La protéine 3680 entière DENV NS3 interagit donc avec les 4 isoformes d'HK.

3681

3682 L'analyse en N2H a permis une nouvelle fois de confirmer l'interaction entre la 3683 protéine NS3 entière et HK2 et HK4 (figures 54.B.a et b). On observe également par cette 3684 technique que les sous-domaines protéase et hélicase sont capables d'interagir avec ces deux 3685 HKs. Ainsi, la protéine DENV NS3, aussi bien sous forme entière que réduite à ses sous-3686 domaines protéase et hélicase, est capable d'interagir avec les quatre isoformes d'HK. Ceci 3687 suggère que l'interaction entre NS3 et les HKs se fait par l'intermédiaire de plusieurs sites 3688 d'interaction situés sur la protéine virale. HK4 étant structuralement très proche de la 3689 structure tertiaire de chaque domaine d'HK2, et HK2 possédant 2 domaines répétés, on peut 3690 également envisager que NS3 interagisse à de multiples sites sur HK2. La cartographie 3691 d'interaction entre NS3 et les HKs reste à déterminer.

3692 2) Effets de NS3 sur le métabolisme cellulaire

3693

L'interaction de NS3 avec les HKs étant confirmée, la seconde partie de ces travaux a consisté à caractériser les conséquences fonctionnelles de ces interactions et à identifier une éventuelle différence entre HK2 et l'HK4 pouvant expliquer la différence de réplication observée entre les cellules HuH7 et les cellules HuH7 HK4+ HK2-.

La première analyse a porté sur les conséquences de l'expression de NS3 sur la glycolyse des
cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2-. Nous avons donc mesuré la consommation de glucose

(figure 55.A) et la sécrétion de lactate (figure 55.B) dans ces deux types cellulaires lorsqu'ils
surexpriment la protéine NS3 entière ou ses sous-domaines. L'expression des protéines
virales a été vérifiée par western-blot dans les cellules et une photographie représentative est
présentée en figure 55.C. (la protéine NS3 entière apparait à un poids moléculaire d'environ
70 kDa, les domaines protéase et hélicase apparaissent à environ 20 kDa et 50 kDa
respectivement).



3706 <u>Figure 55</u>: Effet de l'expression de NS3 sur la glycolyse des cellules HuH7 et HuH7 3707 HK4+ HK2-.

3708 (A&B) Effet de NS3 et de ses sous-domaines sur la consommation de glucose (A) et sur la sécrétion

- de lactate (B) en cellules HuH7 (a) et en cellules HuH7 HK4+ HK2- (b). Brièvement, les cellules ont
- 3710 été transfectées avec un vecteur p3xFlag vide (condition mock) ou p3xFlag-NS3 entière ou NS3-

- 3711 protéase ou NS3-hélicase et cultivées comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». 48
- 3712 heures post-transfection, les surnageants ont été récoltés et la consommation de glucose ainsi que la
- 3713 sécrétion de lactate ont été mesurés comme indiqué précédemment dans le « Matériels et méthodes ».
- 3714 Les résultats sont rapportés aux cellules mock transfectées. Sont présentées les moyennes de trois
- 3715 *expériences indépendantes* ± *erreurs standard. L'évaluation de la significativité a été réalisée par test*
- 3716 *t de Student : n.s.: non significatif, * : p*<*5%, ** : p*<*1%. (C) Western-blot d'expression des protéines*
- 3717 virales réalisé sur des lysats de cellules HuH7 (a) et de cellules HuH7 HK4+ HK2- (b) L'actine sert
- 3718 *de contrôle de charge.*
- 3719

Afin de pouvoir comparer les deux types cellulaires, la consommation de glucose et la sécrétion de lactate ont été arbitrairement fixées à 1 dans la condition contrôle, c'est-à-dire lorsque les cellules ont été transfectées avec un vecteur vide.

Pour ce qui est de la consommation de glucose (**figure 55.A**), l'expression de la forme entière de NS3 induit une augmentation de cette consommation d'environ 1,6 fois pour les HuH7 (**figure 55.A.a**), et de 1,94 fois pour les HuH7 HK4+ HK2- (**figure 55.A.b**). Cette surconsommation est significative pour les deux modèles cellulaires d'après un test de Student (p-value de 0,010 pour les HuH7 et de 0,016 pour les HuH7 HK4+ HK2-).

En revanche, lorsque les cellules sont transfectées pour l'expression de l'un ou l'autre des sous-domaines de NS3 (protéase ou hélicase), l'augmentation de consommation de glucose est absente des cellules HuH7 (1,03 et 0,96 pour les sous-domaine protéase et hélicase respectivement) et très faible dans les HuH7 HK4+ HK2- (1,12 et 1,14 pour les domaines protéase et hélicase respectivement).

3733

Pour ce qui concerne la sécrétion de lactate (figure 55.B) l'expression de NS3 dans les 3734 3735 deux types cellulaires, induit les mêmes effets que pour la consommation de glucose : la 3736 protéine NS3 entière augmente de façon significative la sécrétion de lactate dans les HuH7 3737 (figure 55.B.a) d'un fold de 1,55 (p-value = 0,0054), et dans les HuH7 HK4+ HK2- (figure 3738 **55.B.b**) d'un fold de 1,71 (p-value = 0,000016). De façon semblable à ce qui a été observé 3739 pour le glucose, lorsque les cellules sont transfectées avec l'un ou l'autre des sous-domaines 3740 de NS3 (protéase ou hélicase), la sécrétion de lactate reste inchangée et non significative (0.96 3741 pour le domaine hélicase dans les HuH7 et à 1,04 dans les HuH7 HK4+ HK2- pour les deux 3742 domaines protéase et hélicase). Seule l'expression du domaine protéase dans les HuH7 3743 provoque une augmentation de la sécrétion de lactate (1,35 fois) qui apparait significative.
3744 Globalement, l'expression de la forme entière de la protéine NS3, mais pas de ses sous-3745 domaines protéase et hélicase, induit une augmentation de la consommation de glucose ainsi 3746 qu'une production accrue de lactate dans les cellules transfectées. Ce phénomène est 3747 néanmoins identique dans les deux types cellulaires utilisés et ne permet donc pas d'expliquer 3748 la différence de réplication observée entre les deux types cellulaires. Le fait que les sous-3749 domaines seuls de NS3 n'induisent pas de modification du métabolisme cellulaire, suggère 3750 que malgré leur capacité d'interaction avec les HKs, la fonctionnalité de ces interactions n'est 3751 portée que par la protéine entière.

3752 Comme déjà évoqué plusieurs fois, quelques données de la littérature indiquent que les 3753 lipides sont importants et nécessaires pour une réplication efficace en terme de production et de qualité des virions formés pour le DENV (Fernandes-Siqueira et al., 2018; Samsa et al., 3754 3755 2009). Nous n'avons pas observé de modification majeure du contenu intracellulaire en 3756 lipides neutres lors de la réplication du DENV (figure 50), mais il a été rapporté précisément 3757 que la protéine NS3 était un interacteur de FAS provoquant sa relocalisation au niveau des 3758 sites de réplication du DENV (Heaton et al., 2010). Néanmoins, l'effet de NS3 et de cette 3759 relocalisation de FAS sur la lipogénèse et l'accumulation de lipides neutres intracellulaires 3760 n'a pas été décrit.

3761

Afin de déterminer si l'expression de NS3 seule pouvait modifier la quantité de lipides intracellulaires, les HuH7 et HuH7 HK4+ HK2- ont été transfectées soit avec un plasmide vide (condition mock) soit avec un plasmide 3xFlag permettant l'expression de la protéine NS3 sous forme entière ou ses sous-domaines.

3766 Les cellules ont ensuite été marquées à l'aide d'une sonde fluorescente révélant les 3767 gouttelettes lipidiques contenant les lipides neutres intracellulaires, 48 heures post-3768 transfection. Le marquage des cellules a été analysé par cytométrie en flux comme décrit 3769 précédemment et les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) mesurées pour chaque 3770 condition ont été rapportées à celle des cellules HuH7 (figure 56.A). Leur contenu en lipides 3771 a également été analysé par observation en microscopie de fluorescence après marquage au 3772 red-oil (figure 56.C). L'efficacité de la transfection a été vérifiée par western-blot dont les 3773 résultats sont présentés en figure 56.B.





(A) Quantité de lipides neutres intracellulaires après marquage Bodipy[®] (marquage spécifique des lipides neutres intracellulaires) des cellules 48 heures post-transfection. Brièvement, les cellules ont été transfectées avec un vecteur p3xFlag vide (condition mock) ou un vecteur p3xFlag NS3 entière ou NS3 protéase ou hélicase. Les résultats sont rapportés aux valeurs de fluorescence obtenues pour les cellules HuH7 et sont les moyennes de trois expériences indépendantes ± erreurs standard. La mention n.s. indique un résultat non significatif d'après un test bilatéral de Student au risque alpha de

5%. (B) Western-blot anti-flag de vérification de l'expression des protéines virales représentatif des 3
expériences. L'actine sert de contrôle d'extraction protéique et de chargement des puits. (C) Image de
microscopie à fluorescence au grossissement x200 après marquage à l'huile rouge (ORO pour « Oil
Red O ») comme décrit en « Matériels et méthodes ». Les cellules sont traitées comme en (A) avant la
réalisation du marquage. Les noyaux sont contre colorés au DAPI. Les détails sont précisés dans la
partie « Marquage Oil Red O (ORO) des gouttelettes lipidiques » du « Matériels et méthodes »).

3787 L'ensemble des protéines surexprimées le sont à un niveau semblable (figure 56.B), et
3788 nous permettent donc d'interpréter d'éventuelles modifications du contenu en lipides neutres
3789 intracellulaires.

Comme déjà observé, les résultats obtenus pour le marquage des lipides neutres intracellulaires (**figures 56.A et 56.C**) montrent que la moyenne d'intensité de fluorescence est de base (condition mock transfectées) plus importante dans les cellules exprimant HK4 que celles exprimant HK2.

L'analyse comparative des intensités moyennes de fluorescence entre les différents types de
protéines virales surexprimées pour un type cellulaire donné montre qu'il n'y a aucune
différence significative. Autrement dit, la protéine NS3 entière ou ses sous-domaines seuls ne
semblent pas influer la quantité de lipides neutres intracellulaires.

3798

Les résultats présentés en première partie de ce développement montrant une différence entre l'infection de cellules HuH7 et de cellules HuH7 HK4+ HK2- ne peuvent pas être expliqués par l'effet de la protéine NS3 DENV seule sur le métabolisme des cellules. Ce serait le résultat de mécanismes plus complexes associés à la réplication du virus.

3803 Nous avons donc cherché à déterminer si la différence d'efficacité de réplication entre les
3804 deux modèles hépatocytaires était liée spécifiquement à l'activité d'HK4.

3805	IV. Influence de la modulation de l'activité de l'HK4 sur la réplication
3806	DENV
3807	
3808	La modulation de l'activité HK et ses conséquences sur la réplication du DENV ont
3809	été évaluées grâce au système réplicon.
3810	
3811	Comme expliqué en introduction, à la différence d'HK2, HK4 (pour rappel, appelée aussi
3812	GCK pour glucokinase) dispose d'un régulateur négatif naturel de son activité GKRP (pour
3813	GlucoKinase Regulatory Protein). En effet, lorsque la concentration en glucose chute dans la
3814	circulation systémique, l'activité d'HK4 est inhibée par son interaction avec GKRP. Cette
3815	protéine régulatrice permet de séquestrer HK4 dans le noyau et l'empêche d'exercer son
3816	activité kinase.
3817	Ci-dessous, un schéma simplifié de ce phénomène de régulation par séquestration nucléaire
3818	d'HK4 par GKRP.



3819 <u>Figure 57 :</u> Schéma simplifié de la régulation négative d'HK4 par le régulateur GKRP 3820 d'après (Brouwers et al., 2015).

3821

3822 Sur ce schéma apparaît clairement que la localisation subcellulaire d'HK4 (influencée 3823 par l'interaction avec GKRP) module sa disponibilité pour participer à la glycolyse. Lorsque 3824 l'enzyme doit être fonctionnelle, comme après un repas où la glycémie est importante, il y a 3825 dissociation entre HK4 et GKRP. HK4 se retrouve libre dans le cytoplasme où elle peut 3826 exercer son activité de kinase en phosphorylant le glucose en glucose-6-phosphate favorisant 3827 une synthèse de glycogène (forme de stockage du glucose) ou bien une synthèse de lipides par 3828 lipogenèse de novo. A l'inverse, en cas de jeûne, lorsque le taux de glycémie est faible, 3829 l'activité de l'enzyme doit être limitée afin d'éviter l'hypoglycémie. GKRP s'associe et 3830 séquestre alors HK4. Dans la littérature, plusieurs mutations dans le gène codant pour la 3831 GKRP ont été décrites comme à l'origine d'une mauvaise régulation de HK4 par GKRP.
3832 Certaines mutations ont été décrites comme empêchant l'interaction entre GKRP et HK4.
3833 Nous avons tiré parti de ces observations pour analyser l'impact de la modulation d'HK4 par
3834 GKRP sur la réplication virale.

3835

3836 Nous avons précédemment observé que les cellules exprimant HK4 répliquaient 3837 mieux le DENV. Nous avons donc voulu déterminer si la modulation d'HK4 par son 3838 régulateur naturel pouvait moduler la réplication virale dans ces cellules. Afin d'analyser si la 3839 séquestration de HK4 par GKRP avait cet effet sur la réplication du DENV, les deux modèles 3840 cellulaires HuH7 et HuH7 HK4+ HK2- ont été électroporés avec du rSg et un plasmide 3841 codant pour GKRP soit sous forme normale (pGKRP WT) soit sous forme mutée (pGKRP 3842 D413A) (figure 58). Ce mutant présente un résidu alanine en position 413 à la place d'un 3843 acide aspartique. Cette mutation est connue et décrite dans la littérature (Choi et al., 2013) 3844 pour provoquer la perte d'interaction entre HK4 et GKRP. En d'autres termes, par cette 3845 mutation GKRP ne peut plus séquestrer et donc réguler négativement l'activité d'HK4.



3846 <u>Figure 58 :</u> Effet de la modulation d'HK4 par GKRP sur la réplication rSg DENV dans 3847 les cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2-.

- 3848 Les cellules ont été électroporées avec du rSg et un plasmide contrôle vide (condition
- 3849 « réplicon ») ou un plasmide codant pour l'expression de GKRP (WT ou muté respectivement
- 3850 nommées conditions « réplicon et GKRP » ou « réplicon et ^{D413A}GKRP ») selon les méthodes
- 3851 préalablement décrites. La réplication virale est évaluée 48 heures post-électroporation par

mesure et normalisation de la luminescence comme décrit précédemment. Les résultats sont
rapportés à la condition cellules électroporées avec le plasmide contrôle pour chaque type
cellulaire.

- 3855 Le graphique est la moyenne de 6 expériences réalisées indépendamment ± erreurs standard.
- 3856 *L'évaluation de la significativité entre un type cellulaire et les cellules HuH7 HK4+ HK2- est*
- 3857 réalisée par un test t de Student, unilatéral, n.s. : non significatif, * : p < 5%, *** : p < 1%.
- 3858

3859 On peut observer, sur la figure 58, que la surexpression de GKRP WT ne modifie par 3860 la réplication du DENV en cellules HuH7. Ceci est attendu car GKRP est un régulateur 3861 négatif spécifique de l'HK4. Néanmoins, dans l'équipe, des expériences de recherche 3862 d'interactions entre GKRP et d'autres HK que HK4 ont révélé que GKRP était capable 3863 d'interagir avec HK2. Cette observation a été faite en coIP et en test N2H sur la base d'un 3864 modèle probable de reconstruction 3D de l'interaction. HK2 possède deux domaines 3865 contrairement à HK4 et n'est pas soluble dans le cytoplasme comme HK4. Il est donc 3866 probable que l'interaction entre GKRP et HK2, si elle existe dans les cellules HuH7, ait des 3867 conséquences fonctionnelles non encore décrites. En ce qui concerne ici le DENV, si GKRP 3868 est effectivement capable d'interagir avec HK2, il n'y a pas de conséquences sur la réplication virale lorsque GKRP est surexprimé dans les cellules HuH7. Sans surprise, il en est de même 3869 3870 lorsque c'est la forme mutée non fonctionnelle de GKRP qui est surexprimée.

3871 Dans les cellules HuH7 HK4+ HK2- en revanche, la surexpression de GKRP induit une
3872 diminution significative de la réplication DENV. Au contraire, dans les mêmes conditions, la
3873 surexpression de GKRP sous forme mutée ne permet pas cette diminution de la réplication
3874 DENV. Ces observations indiquent clairement l'implication de HK4 dans la réplication du
3875 DENV et que sa régulation négative permet d'inhiber la réplication virale.

3876

L'association entre HK4 et GKRP est également dépendante du métabolisme du
fructose : alors que le fructose-1-phosphate aura tendance à favoriser la forme libre d'HK4, le
fructose-6-phosphate, lui, aura tendance à favoriser l'interaction entre HK4 et GKRP (figure
59).



3881 <u>Figure 59 :</u> Schéma de la régulation de l'association HK4-GKRP par le fructose-1- ou 3882 6-phosphate.

3883

3884 Afin de confirmer les résultats obtenus par surexpression de GKRP dans les cellules HuH7

3885 HK4+ HK2-, nous avons indirectement testé la conséquence de la modulation de l'association

3886 entre HK4 et GKRP d'origine endogène sur la réplication DENV, en forçant l'interaction

3887 entre les deux partenaires par le traitement au fructose-6-phosphate des cellules.

3888 Les résultats obtenus sont présentés en figure 60.



3889 <u>Figure 60 :</u> Effet de la modulation de l'interaction entre GKRP et HK sur la réplication 3890 du rSg DENV.

3891Les cellules ont été électroporées avec 1µg d'ARN de rSg et 5mM de fructose-6-phosphate selon les3892méthodes préalablement décrites. Les résultats présentés sont obtenus en mesurant la luminescence3893rLuc dans chaque type cellulaire 48 heures post-électroporation en normalisant comme expliqué dans3894les figures précédentes. Sont présentées les moyennes de trois expériences réalisées indépendamment3895 \pm erreurs standard. La significativité entre les cellules non traitées et traitées au fructose-6-phosphate3896pour chaque type cellulaire est évaluée par un test t de Student, bilatéral, n.s. : non significatif, * :3897p<5%.

3898 Dans les cellules HuH7, le fructose-6-phosphate ne semble pas avoir d'effet majeur ou 3899 augmente légèrement la réplication virale. Même si le test statistique indique que la différence 3900 observée est significative, la modulation de réplication est faible dans ces cellules. En 3901 revanche, la réplication DENV en cellules HuH7 HK4+ HK2- est diminuée de façon plus 3902 marquée indiquant à nouveau que la régulation de HK4 par GKRP permet d'inhiber la 3903 réplication du DENV.

3904

3905 L'ensemble de ces résultats obtenus en surexprimant GKRP ou en traitant les cellules 3906 avec du fructose-6-phosphate, montre donc que la réplication virale semble être dépendante 3907 de la localisation subcellulaire d'HK4 et donc de son activité.

3908 Si l'inhibition de l'HK4 par GKRP inhibe la réplication du DENV, nous avons essayé de 3909 réguler positivement l'activité d'HK4 à l'aide d'un activateur chimique spécifique de cette 3910 enzyme (GKA pour *Glucokinase Activator* LY2608204) à l'origine développé pour traiter le 3911 diabète de type 2. Ce composé, comme d'autres GKAs, se fixe au niveau d'une poche d'HK4 3912 distincte du site actif de l'enzyme et du régulateur GKRP. L'efficacité de la molécule à la 3913 concentration en glucose dans le milieu de 25mM n'étant peut-être pas optimale du fait d'une 3914 activité glycolytique intrinsèquement déjà très importante dans ces lignées cancéreuses, une 3915 série d'expériences a été réalisée à 5mM de glucose.

3916 Les résultats obtenus sont présentés en figure 61.



3917 Figure 61 : Effet du LY2608204 sur la réplication rSg DENV.

3918 Les cellules ont été électroporées avec du réplicon rSG DENV comme précédemment. 4 heures post-

3919 électroporation, les milieux de cultures sont changés pour des milieux neufs à 5 ou 25mM de glucose 3920 avec ou sans 500nM de LY2608204. (A) Luminescence rLuc mesurée dans les cellules HuH7 et HuH7 3921 HK4+ HK2- cultivées à 5 ou 25mM de glucose avec ou sans LY2608204. Les résultats sont rapportés 3922 aux valeurs obtenues sans traitement au LY2608204 pour chaque type cellulaire. Sont présentées les 3923 moyennes de six expériences indépendantes \pm erreurs standard. L'évaluation de la significativité entre 3924 deux conditions d'étude avec et sans traitement LY2608204 est réalisée par un test t de Student, 3925 unilatéral, n.s.: non significatif, *: p < 5%, **: p < 1%. (B) Consommation de glucose de cellules 3926 HuH7 et HuH7 HK4+ HK2- cultivées à 5 ou 25mM de glucose avec 0µM/0,05µM/0,1µM/0,5µM/1µM 3927 ou 5µM de LY2608204. Les valeurs obtenues ont été exprimées en fold de la valeur obtenue sans 3928 traitement au LY2608204.

3929

3930 Nous observons sur la figure 61.A, que dans les cellules HuH7, le traitement 3931 LY2608204 ne semble pas influencer la réplication DENV aussi bien lorsque les cellules sont 3932 cultivées à 5mM ou à 25mM de glucose. D'ailleurs, cette molécule dont l'activité est 3933 spécifique de l'HK4 n'a aucun effet sur la consommation cellulaire de glucose quelle que soit 3934 la condition de culture considérée (figure 61.B). A l'inverse, en cellules HuH7 HK4+ HK2-, 3935 le traitement au LY2608204 semble diminuer la réplication DENV de façon significative 3936 (figure 61.A). En ce qui concerne la consommation de glucose (figure 61.B), le traitement 3937 LY2608204 semble avoir un effet inducteur de la consommation de glucose visible à 5mM 3938 mais pas à 25mM. En effet, à 5mM de glucose, le traitement LY2608204 augmente de façon dose dépendante la consommation de glucose des cellules HuH7 HK4+ HK2-, sans doute 3939 3940 dans des conditions de culture permettant ici d'observer l'augmentation d'activité de l'HK4.

3941 Ainsi de façon assez surprenante, la réplication du virus semble être fortement inhibée lorsque 3942 l'activation de la glycolyse est patente dans notre système de culture. Le LY2608204 n'avant 3943 pas d'effet mesurable sur la consommation de glucose par les cellules, aux concentrations 3944 habituelles de glucose dans le milieu de culture et auxquelles l'ensemble des expériences de 3945 réplication du virus ont été réalisées, il nous est donc difficile de conclure sur ces 3946 observations. Nous ne pouvons que formuler des hypothèses quant à l'effet d'une activation 3947 de HK sur son transport ou non au noyau en présence ou non des protéines virales et qui 3948 seront discutées dans la partie « Discussion et conclusions » de ce manuscrit.

3949

Comme présenté plus haut, outre la régulation négative de l'activité HK4 par GKRP,
GKRP modifie la localisation subcellulaire d'HK4 en la transportant depuis le cytoplasme
vers le noyau. Sachant que NS3 est capable d'interagir avec l'enzyme, nous nous sommes

interrogés sur l'effet de la présence de NS3, sur l'interaction entre GKRP et HK4 et sur
l'interaction éventuelle de NS3 avec GKRP (figure 62).



3955 **Figure 62 : Interaction de DENV NS3 avec GKRP.**

Résultats obtenus par 3 expériences indépendantes de complémentation de la nanoluciférase (N2H),
technique présentée en « Matériels et méthodes ». L'expérience a été menée de la même façon que

3958 *celle décrite en figure 54.B mais avec transfection de plasmides pour l'expression de NS3 et GKRP.*

3959

Lorsque nous avons recherché si NS3 ou ses domaines pouvaient interagir avec les différentes HK, a été introduit dans le criblage des interactions la protéine GKRP. Et en effet, aussi bien la protéine NS3 entière que seulement ses sous-domaines sont capables d'interagir avec GKRP (**figure 62**). L'identification de ce nouveau partenaire de NS3 nous a conduits à rechercher quelle pouvait être l'influence de l'expression de GKRP sur la localisation de NS3 (**figure 63**).



3966 <u>Figure 63</u>: Localisation subcellulaire de DENV NS3 suivant le type cellulaire et la 3967 surexpression ou non de GKRP.

Les cellules ont été électroporées avec le rSg DENV et un plasmide codant GKRP ou le vecteur vide
comme précédemment. Les cellules ont été récupérées 48 heures post-électroporation, lysées et
fractionnées comme décrit dans le « Matériels et méthodes » dans le paragraphe X. intitulé
« Fractionnement cellulaire ».

3972 Les résultats représentés ici sont le résultat d'une expérience réalisée une fois. Chaque compartiment
3973 cellulaire (cytoplasme, mitochondrial ou nucléaire) a été analysé par western-blotting pour
3974 l'expression de NS3 ainsi qu'un contrôle spécifique du compartiment en question (actine pour le
3975 cytoplasme, VDAC pour la mitochondrie ou l'histone H3 pour le noyau).

3976

L'expression de NS3 est bien propre aux lysats cellulaires obtenus à partir de cellules électroporées avec du rSg de DENV montrant la spécificité du marquage NS3. L'actine, protéine du cytosquelette cellulaire est utilisée ici comme contrôle de charge pour le westernblot de la fraction cytoplasmique. VDAC (*Voltage Dependant Anion Channel*), protéine enchâssée dans la membrane externe mitochondriale, sert de contrôle de charge des puits pour le compartiment mitochondrial. Enfin, l'histone H3, protéine intervenant au cours de la division cellulaire, sert de contrôle de charge pour la fraction nucléaire.

En cellules HK4, aucune différence n'est observée quant à l'expression de NS3 dans les fractions mitochondriale ou nucléaire avec ou sans expression de GKRP. En revanche, dans la fraction cytoplasmique, l'expression de GKRP diminue le taux de NS3 exprimée. Cette observation suggère que l'interaction entre GKRP et NS3 pourrait avoir une conséquence sur la disponibilité de NS3 dans le cytoplasme et donc sa disponibilité pour participer à la réplication virale. On pourrait également s'interroger sur la capacité de GKRP à séquestrer NS3 au noyau, même si aucune modification de la présence de NS3 dans la
fraction nucléaire n'est observée ici sur cette unique manipulation.

3992 Dans l'ensemble de notre étude nous avons recherché l'effet de l'interaction entre NS3 3993 et les protéines cellulaires sur l'activité ou la régulation de ces mêmes protéines cellulaires. 3994 La question inverse se pose également, à savoir si l'interaction des partenaires cellulaires avec 3995 NS3 module l'activité de la protéine NS3 du DENV. Nous avons donc engagé l'analyse de 3996 l'effet de l'interaction sur l'activité protéase de NS3. Pour cela des cellules HuH7 ou HuH7 3997 HK4+ HK2-, c'est-à-dire exprimant soit HK2 soit HK4, ont été électroporées avec l'ARN rSg 3998 comme précédemment et l'activité NS3 a été mesurée dans les homogénats cellulaires à l'aide 3999 d'un substrat synthétique.



4000 <u>Figure 64 :</u> Activité protéase de NS3 du DENV en cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2-.

4001 Les cellules ont été électroporées et traitées selon les méthodes préalablement décrites. Les lysats

4002 cellulaires obtenus ont ensuite été utilisés pour mesurer l'activité NS3 protéase du DENV. Brièvement,

4003 un substrat fluorescent a été ajouté dans les lysats et l'activité protéase a été mesurée en temps réel

4004 par fluorimétrie (mesurée au TECAN). L'activité protéase cellulaire mesurée sur des lysats de cellules

4005 ne contenant pas de réplicon et traitées dans les mêmes conditions a été soustraite. Les résultats ont

4006 également été normalisés par l'activité réplicative mesurée dans chaque type cellulaire afin de

- 4007 s'affranchir de la quantité relative de NS3 présente dans chaque condition.
- 4008 Les résultats représentés ici sont le résultat d'une expérience réalisée une fois.
- 4009

4010 Les résultats présentés ici en **figure 64**, semblent indiquer que l'activité NS3 protéase 4011 est identique quel que soit le type cellulaire étudié n'expliquant ainsi pas la différence de 4012 réplication observée entre les deux types cellulaires. Néanmoins une légère augmentation est visible ici dans les cellules exprimant HK4 qui pourrait laisser penser que l'effet de HK4 sur
NS3 protéase est positif. Bien entendu ces résultats sont préliminaires et devront être
approfondis afin de déterminer si oui ou non l'interaction avec HK4 a un effet sur l'activité
protéase de NS3. Une autre hypothèse est que GKRP, lorsqu'il interagit avec HK4, puisse
perturber l'interaction entre NS3 et HK4 qui elle serait favorable à l'activité de NS3. Ceci

4018 devra également être testé.

Discussion & conclusions

4019 Le principal objectif de cette thèse est d'analyser la réplication du DENV dans un 4020 modèle d'hépatocyte exprimant l'isoenzyme 4 d'hexokinase normalement exprimé dans 4021 l'hépatocyte humain. En comparaison des lignées hépatocytaires couramment utilisées pour 4022 étudier la réplication virale, ce nouveau modèle généré préalablement par l'équipe possède 4023 une lipogenèse restaurée lui permettant d'accumuler les lipides neutres sous forme de 4024 gouttelettes lipidiques intracellulaires comme le ferait un hépatocyte normal. Comme des 4025 données de la littérature indiquaient une interférence entre métabolisme glucido-lipidique et 4026 réplication du DENV, nous nous sommes proposés de caractériser la réplication dans ce 4027 modèle cellulaire afin de comprendre les mécanismes moléculaires de contrôle du 4028 métabolisme par le virus. Une seconde partie du projet était basée sur l'identification d'une 4029 interaction entre la protéine NS3 du DENV et les HKs suggérant une interférence directe 4030 entre réplication virale et activité glycolytique via cette interaction protéine-protéine. Nous 4031 avons donc analysé les conséquences fonctionnelles de cette interaction en comparant la 4032 réplication du DENV dans des cellules exprimant HK2 (HuH7) ou HK4 (HuH7 HK4+ HK2-). 4033

4034 Nous avons ainsi pu observer que les cellules exprimant HK4 fournissaient un 4035 environnement plus favorable pour la réplication virale que les lignées exprimant HK2 qui 4036 sont couramment utilisées pour étudier sa réplication dans l'hépatocyte. Même si nous 4037 n'avons pas pu complètement déterminer les mécanismes sous-jacents, nous avons pu 4038 découvrir que la réplication dans les cellules exprimant HK4 était inhibée par la protéine 4039 GKRP, régulateur négatif de l'HK4, et que cette protéine GKRP était capable comme HK4 4040 d'interagir avec NS3. L'ensemble des observations réalisées lors de cette étude montre qu'il 4041 existe sans doute un mécanisme fin d'interférence entre NS3 et les protéines cellulaires de la 4042 première étape de la glycolyse dans les cellules exprimant HK4.

4043

4044 Le modèle hépatocytaire généré et utilisé pour ces travaux a été obtenu à partir de la 4045 lignée HuH7 dans lequel l'expression d'HK2 a été remplacé par HK4, isoforme normalement 4046 exprimé dans des hépatocytes sains. La caractérisation du modèle d'HuH7 HK4+ HK2-, par 4047 comparaison avec le modèle HuH7, a montré que ces cellules ont une charge énergétique plus 4048 importante (accumulation d'ATP notamment), contiennent plus de glycogène, sont capables 4049 de réaliser de la lipogenèse de-novo et sécrétaient des lipoprotéines de très faible densité 4050 (Perrin-Cocon et al., 2020) (Données en cours de publication). En cela, il constitue ainsi un 4051 modèle de choix pour évaluer les conséquences du métabolisme cellulaire hépatique sur la 4052 réplication virale et inversement.

Le premier axe de recherche a porté sur la modulation de la glycolyse . Cette voie centrale du métabolisme cellulaire dont les différents produits intermédiaires pourront être utilisés comme substrats d'autres voies métaboliques telles que la lipogenèse *de novo*, la synthèse de pyrimidines ou d'acides nucléiques, toutes nécessaires à la réplication et à l'assemblage viral (Mulukutla et al., 2016; Quek et al., 2010; Zou and Al-Rubeai, 2016).

4058

4059 Les virus sont des parasites obligatoires et le nombre restreint de protéines codées par 4060 leur génome est insuffisant pour permettre la synthèse de l'ensemble des structures, molécules 4061 et protéines nécessaires à leur réplication. Ainsi, les protéines virales possèdent la plupart du 4062 temps des fonctions assez diverses qui vont au-delà de leur activité intrinsèquement liée à la 4063 synthèse du génome viral, le processing des protéines virales ou leur assemblage pour former 4064 de nouveaux virions. Un nombre important de ces fonctions sont primordiales à 4065 l'établissement de l'infection et sont le fruit du réseau d'interactions qu'elles peuvent établir 4066 entre elles et les protéines cellulaires. Ceci est particulièrement décrit pour l'interférence des 4067 protéines virales avec les protéines impliquées dans l'immunité innée cellulaire. Ainsi pour le 4068 DENV, il a été établi que plusieurs des protéines NS étaient capables d'interférer avec la 4069 signalisation des récepteurs à l'IFN et des MAVS (Zeidler et al., 2017). Au-delà, de 4070 l'interférence avec les défenses de l'hôte, les virus sont capables de réorienter certaines voies 4071 métaboliques cellulaires pour produire de nouvelles particules virales et permettre notamment 4072 la structuration de compartiments de réplication (Glingston et al., 2019). Ce phénomène 4073 s'accompagne de perturbations des membranes nucléaires, du réticulum endoplasmique ou 4074 encore des membranes mitochondriales. Dans le cas du DENV, il a été observé dans les 4075 cellules C6/36 d'Aedes albopictus que l'ARN viral se localisait sur le RE et que l'infection 4076 produisait des invaginations membranaires lisses à l'intérieur du RE pour l'assemblage des 4077 particules (Grief et al., 1997). Dans les cellules HuH7, l'infection conduit à de multiples 4078 invaginations de la membrane du RE entraînant la formation de sphérules ou de vésicules 4079 contenant de l'ARN double brin (Welsch et al., 2009).

4080

Les virus sont également capables de détourner des activités enzymatiques normalement physiologiques de l'hôte. Par exemple, la glycosylation est une modification post-traductionnelle cruciale pour de nombreuses fonctions cellulaires. Les protéines d'enveloppe virale de divers agents pathogènes humains, dont HIV, le virus de la grippe, le virus de Lassa, le SRAS, le virus Zika, le DENV et le virus Ebola ont évolué pour être largement glycosylées. Ces glycanes dérivés des cellules hôtes facilitent divers rôles

structurels et fonctionnels au cours du cycle viral, allant de l'évasion immunitaire à 4087 4088 l'amélioration de l'infection des cellules cible (Watanabe et al., 2019). Au-delà des particules 4089 virales, il a été montré pour le DENV que l'interaction de NS1 avec, entre autre, le complexe 4090 oligosaccharyltransferase (OST) intervient dans la glycosylation de NS1 et NS4B. 4091 L'inhibition pharmacologique de la fonction de N-glycosylation de ce complexe permet 4092 d'ailleurs d'inhiber l'infection par ce DENV (Hafirassou et al., 2017). Parfois cette 4093 interférence entre voies de biosynthèses cellulaires et cycle de réplication virale va jusqu'à 4094 l'incorporation de protéines cellulaires dans la particule virale conduisant à des particules 4095 hybrides comme cela a été montré pour HCV qui s'enveloppe dans des LVPs (Lavie and 4096 Dubuisson, 2017).

4097

4098 Cette exploitation des ressources cellulaires se fait également d'un point de vue 4099 énergétique (Fernandez-Garcia et al., 2009; Goodwin et al., 2015). De nombreux virus ont 4100 été décrits comme capables d'induire la glycolyse de la cellule hôte en stimulant l'activité des 4101 enzymes impliquées dans la glycolyse et/ou en augmentant leur niveau d'expression pour 4102 répondre aux besoins accrus de la cellule infectée. Pour beaucoup de virus, ces perturbations 4103 de la glycolyse sont similaires à l'effet Warburg préalablement décrit dans les cellules 4104 cancéreuses (Sanchez and Lagunoff, 2015; Thaker et al., 2019). Cet effet se traduit par une 4105 consommation accrue de glucose et une sécrétion de lactate par les cellules infectées malgré 4106 la présence d'oxygène. La phosphorylation oxydative est limitée et la cellule utilise 4107 principalement la glycolyse aérobie. Les premières études qui ont décrit ce phénomène ont 4108 porté sur les virus à ADN, en particulier ceux responsables du développement de cancers. Le 4109 HCMV fait partie de ceux-ci et a notamment été montré pour induire une consommation plus 4110 importante de glucose en augmentant l'expression du transporteur GLUT4, conduisant à une 4111 accumulation de différents intermédiaires glycolytiques sous contrôle de l'AMPK (Landini, 4112 1984; McArdle et al., 2012; Rodriguez-Sanchez and Munger, 2019; Yu et al., 2011b). Il a été 4113 le premier virus à faire l'objet d'une étude de fluxomique utilisant la chromatographie liquide 4114 couplée à la spectrométrie de masse (Munger et al., 2006). Ces études, couplées à des 4115 analyses de l'expression des ARNm par microarray, ont mis en évidence qu'au cours de 4116 l'infection HCMV, il y avait une augmentation des différents métabolites de la glycolyse, du 4117 cycle de l'acide tricarboxylique et de biosynthèse des pyrimidines mais aussi une 4118 augmentation des différentes enzymes impliquées dans ces réactions de biosynthèse.

4119 De façon similaire, d'autres virus conduisant au développement de cancers comme les 4120 adénovirus (HadV), HPV, KSHV, EBV, induisent également un effet type Warburg au sein 4121 des cellules infectées malgré la présence d'oxygène via des interactions directes avec des 4122 protéines du métabolisme cellulaire. Par exemple, HadV a été montré pour doubler les 4123 consommations de glucose et quadrupler les sécrétions de lactate par rapport à des cellules 4124 non-infectées (Silva et al., 2016). Cette surconsommation serait liée aux interactions des 4125 oncoprotéines E4ORF1 et EA1 avec des protéines (comme TRAPP, un protéine permettant la 4126 transcription du gène MYC) induisant la transcription de gènes codants pour des protéines du 4127 métabolisme (Prusinkiewicz and Mymryk, 2019).

4128

4129 Pour HPV, les oncoprotéines E6 et E7 ont été montrées pour également contribuer à la 4130 mise en place de l'effet Warburg en augmentant l'activité enzymatique des enzymes de la 4131 glycolyse comme les HKs ou la pyruvate kinase ou encore en stimulant l'expression des 4132 transporteurs GLUTs et SGLTs du glucose (Martinez-Ramirez et al., 2018). D'autres virus à 4133 ARN, comme les Flaviviridae, tels qu'HCV ou DENV augmentent également la glycolyse 4134 dans les cellules infectées et ce encore une fois selon un mécanisme de type Warburg. 4135 L'augmentation de la glycolyse de l'hépatocyte infecté par HCV est liée, au moins en partie, à 4136 une interaction directe entre la protéine NS5A, et plus précisément de son domaine D2, avec 4137 l'HK2 cellulaire activant alors cette enzyme (Ramiere et al., 2014).

4138

4139 Néanmoins pour le DENV, même si des études montrent une augmentation de la 4140 glycolyse explicable par l'augmentation d'expression de HK2 et du transporteur GLUT1 dans 4141 des fibroblastes (Fontaine et al., 2015), aucune étude ne détaille, à notre connaissance, quelles 4142 protéines virales sont responsables de ce phénomène.. De plus, globalement, peu d'études ont 4143 permis d'identifier et caractériser les altérations du métabolisme global dans le cas d'infection 4144 au DENV. L'ensemble des expériences d'infections réalisées dans ce projet avec la forme 4145 entière ou subgénomique du virus confirment que l'infection par le DENV est responsable 4146 d'une augmentation de la consommation de glucose dans les deux modèles hépatocytaires 4147 étudiés. A l'inverse de ce qui est observé pour d'autres virus, l'infection par le DENV ne 4148 semble pas avoir de conséquence sur le niveau d'expression des transporteurs GLUTs quel 4149 que soit la lignée hépatocytaire que nous ayons testée.

L'augmentation de la glycolyse est également observée dans les cellules transfectées pour
l'expression de NS3 entière seule, qu'elles expriment HK2 ou HK4. En revanche, la
réplication du DENV est augmentée spécifiquement lorsque HK4 est exprimé et cela de façon

4153 dose-dépendante. De plus, l'infection DENV dans des cellules surexprimant HK2 avec une activité HK globale aussi élevée que celle des HuH7 HK4+ HK2- montre que la plus forte 4154 4155 réplication n'est pas imputable à plus d'activité HK, mais est bien spécifique à l'isoforme 4156 d'HK qu'elles expriment. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre NS3 et HK4 n'aurait 4157 pas seulement pour conséquence l'augmentation d'activité de l'enzyme qui permettrait alors 4158 plus de glycolyse. Or, nous avons certes observé que la protéine NS3 interagissait directement 4159 avec toutes les HKs mais également avec le régulateur négatif d'HK4, GKRP. L'infection 4160 virale dans notre modèle d'étude ne semble donc pas être uniquement responsable d'une 4161 activation de l'HK expliquant la surconsommation de glucose mais sans doute d'une levée de 4162 la régulation d'HK4 par GKRP. Nous y reviendrons plus loin dans la discussion.

4163

4164 Les HKs constituent une famille de protéines kinases assurant la transformation du 4165 glucose en glucose-6-phosphate lors de la première étape de la glycolyse et dont 5 isoenzymes 4166 (HK1, 2, 3, 4 et HKDC1) ont été identifiés à ce jour (Arora et al., 1993; Katzen and Schimke, 4167 1965; Preller and Wilson, 1992; Pusec et al., 2019; White and Wilson, 1989; Wilson, 1997). 4168 HK2 est surexprimée dans pratiquement toutes les cellules cancéreuses, y compris le 4169 carcinome hépatocellulaire, et il a été montré qu'elle joue un rôle majeur dans l'effet Warburg 4170 et l'oncogenèse. HK4 est l'isoenzyme qui est exprimée dans les hépatocytes normaux. Par 4171 conséquent, toutes les études in-vitro utilisant des lignées ont été réalisées avec des cellules 4172 exprimant le type cancéreux HK2 et non l'isoenzyme HK4 spécifique aux hépatocytes. Ces 4173 deux isoenzymes ont des paramètres catalytiques différents. Si HK2 a une cinétique 4174 Michaelienne classique, HK4 a un comportement allostérique (Whittington et al., 2015). 4175 Alors qu'HK2 a une affinité élevée pour le glucose (faible Km, Km \approx 50µM), HK4 a une 4176 affinité plus faible pour son substrat (Km \approx 5mM) qui la rend moins active et étroitement 4177 régulée sous la concentration sanguine de glucose. HK4 n'est actif que lorsque le glucose est 4178 abondant et n'est pas inhibé par son produit, le glucose-6-phosphate, de sorte que la vitesse de 4179 réaction est déterminée par la disponibilité en glucose et non par la demande de produits 4180 finaux de la glycolyse (Neary and Pastorino, 2013). Dans les hépatocytes, en réponse à une 4181 glycémie élevée, les produits glycolytiques sont utilisés pour synthétiser des AGs qui sont 4182 incorporés dans les TGs, les phospholipides et/ou les esters de cholestérol. Ces lipides 4183 complexes sont stockés dans des LDs et des structures membranaires, ou sécrétés dans la 4184 circulation sous forme de lipoprotéines de très faible densité. Chez les patients atteints de 4185 stéatose hépatique, la lipogenèse de novo contribue pour un tiers des TGs hépatiques. Les 4186 données cliniques indiquent qu'une activité HK4 accrue est impliquée dans la pathogenèse du 4187 foie gras (ou NAFLD) et l'élévation des TGs plasmatiques. L'interférence de la réplication du 4188 DENV avec la lipogenèse a été rapportée dans la littérature avec une observation majeure 4189 quant à notre étude qui est l'interaction directe de NS3 avec la FAS qui a pour conséquence 4190 d'augmenter son activité. Bien que des observations cliniques existent sur la stéatose 4191 hépatique provoquée par le DENV (Estofolete et al., 2019; Povoa et al., 2014; Samanta and 4192 Sharma, 2015), il a été rapporté dans une étude que suite à l'infection par le DENV de 4193 cellules hépatocytaires en culture (c'est-à-dire exprimant HK2), la taille des gouttelettes 4194 lipidiques était diminuée (Heaton and Randall, 2010). Nous avons observé que les cellules 4195 HuH7 exprimant HK4, capables de lipogenèse de novo, répliquaient mieux le virus que des 4196 cellules HuH7 qui expriment seulement HK2. Nous avons fait l'hypothèse que dans ce 4197 modèle cellulaire, nous pourrions observer une induction de la synthèse lipidique qui se 4198 traduirait par une accumulation de lipides neutres intracellulaires. Nous n'avons pas observé 4199 d'augmentation de leur contenu lipidique suite à l'infection. Au contraire nous avons observé 4200 une tendance à une diminution du contenu lipidique des cellules et qui était significative pour 4201 les cellules HuH7 HK4+ HK2-. Nos observations confortent les données obtenues dans les cellules exprimant uniquement HK2. Néanmoins nous ne pouvons pas exclure une 4202 4203 augmentation de la synthèse lipidique lors de l'infection des cellules HuH7 HK4+ HK2-, car nous avons observé une augmentation de la consommation de glucose. Cette synthèse accrue 4204 4205 de lipides pourrait passer inaperçue si ces lipides sont immédiatement consommés pour les 4206 besoins accrus de la cellule qui réplique activement le virus et comme cela a été proposé par 4207 Siqueira et al. (Fernandes-Siqueira et al., 2018). Ainsi l'augmentation de la lipogenèse dans 4208 ce nouveau modèle d'HuH7 HK4+ HK2- induite par l'infection pourrait être plus favorable 4209 pour la réplication sans pour autant se traduire en une accumulation intracellulaire de lipides 4210 neutres. D'autre part, le fait d'observer une meilleure réplication dans les cellules possédant 4211 un contenu lipidique plus important est cohérent avec les observations cliniques décrivant une 4212 sévérité accrue de la pathologie chez les patients ayant une stéatose hépatique (Suwarto et al., 4213 2018).

4214 Afin de répondre définitivement à cette question, des analyses de fluxomique 4215 devraient permettre de définir exactement quelles sont les voies métaboliques activées suite à 4216 l'augmentation de glycolyse observée lors de l'infection. Ainsi, l'analyse comparative de 4217 l'incorporation de métabolites marqués devrait permettre de mieux identifier la réorientation 4218 par le virus des ressources métaboliques de la cellule. 4219 Si l'on compare les modes de régulation de l'activité d'HK2 et d'HK4 qui sont décrits 4220 dans la littérature, d'autres différences apparaissent. Parmi elles, l'une des différences 4221 majeure est l'existence d'un régulateur négatif et spécifique de l'activité de HK4 : GKRP (de 4222 la Iglesia et al., 2000; Jin et al., 2015; Van Schaftingen, 1989). Cette protéine par interaction 4223 directe avec HK4 est responsable d'un maintien d'HK4 en conformation ouverte l'empêchant 4224 ainsi d'exercer son activité HK (Matschinsky and Wilson, 2019). Elle est également 4225 responsable de la séquestration au niveau nucléaire d'HK4 l'empêchant ainsi doublement 4226 d'exercer son activité enzymatique par régulation de sa localisation subcellulaire (Hussain et 4227 al., 2015).

4228 Nous avons observé que la modulation d'HK4 par surexpression de GKRP ou la régulation de 4229 l'association entre HK4 et GKRP endogène par le glucose-6-phosphate, induit une inhibition 4230 de la réplication DENV. Cela suggère que l'interaction entre NS3 et HK4 pourrait être 4231 fonctionnelle, puisque la perturbation par GKRP de cette interaction inhiberait la réplication 4232 virale. On peut imaginer que GKRP joue le rôle de compétiteur de NS3 pour interagir avec 4233 HK4 et ainsi empêcher l'activité hexokinase d'HK4 qui serait favorable pour la réplication 4234 virale. Mais, ni l'infection virale, ni la surexpression de NS3 dans les cellules n'augmentent 4235 l'activité HK globale mesurée. L'effet de GKRP sur la réplication virale ne serait donc pas 4236 seulement lié à l'interférence avec l'activité glycolytique mais à la relocalisation possible 4237 d'HK4 dans le noyau.

4238 Néanmoins, le traitement des cellules au galactose, hexose permettant la synthèse de 4239 glucose-6-phosphate sans l'activité des HKs, induit une diminution de la réplication DENV seulement dans les cellules HuH7 HK4+ HK2-. Spécifiquement cette observation indique 4240 4241 qu'une activité hexokinase est nécessaire pour la réplication supérieure dans les cellules 4242 HuH7 HK4+ HK2- mais est en contradiction avec la dé-corrélation observée entre activité 4243 HK intracellulaire mesurée et réplication virale (figure 46). Nous n'avons pas vérifié quel 4244 pouvait être l'effet du galactose sur l'interaction entre GKRP et HK4. Peut-être que l'effet 4245 observé sur la réplication n'est en fait que l'effet de la relocalisation au noyau de HK4 suite 4246 au traitement par le galactose. Cette hypothèse devra être vérifiée.

4247

Le métabolisme lipidique constitue également une voie importante pour l'infection virale depuis l'infection jusqu'à la genèse de nouveaux virions (Heaton and Randall, 2011). De nombreux virus utilisent les lipides pour permettre leur endocytose en utilisant directement les récepteurs aux lipides comme récepteurs d'entrée comme par exemple HCV qui exploite la reconnaissance d'apolipoprotéines de l'hôte présentes dans l'enveloppe des 4253 LVPs, avec la reconnaissance d'ApoE par les LDL-R (Douam et al., 2015). Dans le cas du 4254 DENV, le métabolisme lipidique semble également avoir une place clé permettant à la fois 4255 d'amorcer les étapes initiales de l'infection (Carro and Damonte, 2013) et de contrôler 4256 l'infection en empêchant une fusion des membranes virale et endosomale précoce qui serait 4257 délétère au virus (Zaitseva et al., 2010). Bien que nous n'ayons pas observé de différence 4258 significative de l'infectivité spécifique des particules produites par les cellules HuH7 HK4+ 4259 HK2-, nous ne savons pas si ces cellules produisent des particules avec une composition 4260 lipidique différente. Il serait intéressant d'analyser particulièrement si les particules produites 4261 dans des lignées exprimant les différentes HKs ont une infectivité spécifique différente vis-à-4262 vis d'hépatocytes ou de cellules immunitaires par exemple.

4263

4264 Les lipides sont aussi utilisés pour la structuration des organelles de réplication (Miller 4265 et al., 2007) et l'induction de la synthèse de lipides participe également directement à la 4266 genèse des membranes des virions en cours de formation par acquisition de l'enveloppe du 4267 DENV à partir de la membrane du RER de l'hôte cellulaire (Welsch et al., 2009). Dans notre 4268 étude, la réplication du DENV est corrélée à la quantité d'HK4 exprimée dans les cellules qui 4269 est elle-même positivement corrélée à la quantité de lipides neutres intracellulaires dans les 4270 cellules. Ces résultats laissent penser que la plus forte réplication en cellules HuH7 HK4+ 4271 HK2- serait liée à la quantité de lipides disponible dans ces cellules. La restauration de la lipogenèse dans les cellules HuH7 HK4+ HK2- permettrait la fourniture de lipides nécessaires 4272 4273 pour la formation des complexes de réplication. L'utilisation de ces lipides comme ressource 4274 supplémentaire pour l'assemblage de nouveaux virions, même si elle ne peut être exclue, ne 4275 semble pas privilégiée étant donné que l'augmentation de réplication observée avec le 4276 réplicon ne tient pas compte de l'assemblage de particules. Quoiqu'il en soit, nos observations 4277 sont encore une fois cohérentes avec les données de la littérature montrant l'activation et le 4278 recrutement de la FAS dans les structures de réplication du virus dans des cellules HuH7 4279 infectée par le DENV (Heaton et al., 2010).

4280

Les lipides peuvent également être utilisés comme source d'énergie nécessaire au fonctionnement des différentes enzymes cellulaires et virales lors de la réplication. Là encore, l'analyse comparative du contenu en ATP et ADP des cellules HuH7 et HuH7 HK4+ HK2nous indique que même si ces deux types cellulaires n'ont pas de différence du rapport ATP/ADP, le contenu en ATP est supérieur dans les cellules exprimant HK4. Cette disponibilité supérieure en ATP pourrait être un élément déterminant de l'efficacité de 4287 réplication dans les cellules HuH7 HK4+ HK2-. Quelques observations nous invitent à penser 4288 que cette utilisation des lipides comme source d'énergie pourrait effectivement avoir un effet 4289 positif sur la réplication. En effet, la quantification des TGs et le marquage des lipides neutres 4290 intracellulaires montrent que l'infection DENV ne permet pas de les moduler et au mieux 4291 permettrait une diminution des lipides intracellulaires. La surexpression de NS3 augmente la 4292 glycolyse cellulaire, mais n'a aucun effet sur la quantité de lipides neutres intracellulaires 4293 indiquant que ce surcroit d'apport ne se traduit pas par une accumulation de lipides. Ces 4294 résultats peuvent peut-être s'expliquer grâce aux travaux de Siqueira et al. montrant que le 4295 DENV est capable de moduler à la fois la biogenèse et la catalyse des lipides, ce qui apparait 4296 au premier abord contradictoire (Fernandes-Siqueira et al., 2018). Le DENV stimule la genèse 4297 lipidique afin d'accumuler des stocks d'énergie sous forme de gouttelettes lipidiques mais va 4298 également mobiliser cette énergie en dégradant ces gouttelettes et les acides gras qu'elles 4299 contiennent par β oxydation. La résultante serait une absence de modulation visible à un 4300 instant donné bien qu'une dynamique des lipides soit présente. Ces travaux démontrent 4301 également un lien entre le métabolisme du glucose et celui des lipides : la consommation de 4302 glucose joue le rôle d'anaplérose pour la voie de la lipogenèse (Fernandes-Siqueira et al., 4303 2018). L'augmentation de consommation de glucose permet une accumulation d'acétyl-CoA 4304 permettant lui-même une accumulation de citrate par transformation par le cycle de Krebs. Le 4305 citrate produit serait utilisé pour la synthèse d'AGs. Les observations de Fernandes-Siqueira 4306 et al. ont été réalisées dans des cellules exprimant uniquement l'HK2. Dans notre modèle 4307 HuH7 HK4+ HK2- où la lipogenèse est restaurée, cette induction de lipogenèse 4308 potentiellement favorable à plus de β oxydation pourrait expliquer la réplication supérieure 4309 dans ces cellules.

4310

D'autre part, nous avons observé que l'ajout exogène de lipides, comme l'acide oléique ou palmitique, dans le milieu de culture conduit bien à une augmentation de la quantité de lipides neutres intracellulaires mais est sans effet sur la réplication virale des cellules infectées. Ce serait donc bien l'apport des glucides à la lipogenèse qui serait favorable à la réplication virale et non le réarrangement des lipides exogènes apportés.

Aussi, pour la continuité de ce projet, il serait intéressant de faire des études de fluxomiques
en s'intéressant particulièrement aux voies de la glycolyse et du métabolisme des lipides afin
d'évaluer les perturbations induites par le DENV. L'utilisation d'un marquage de type au
carbone 13 de molécules de glucose serait intéressant afin de comprendre le devenir des
carbones du glucose, des intermédiaires de la glycolyse et des voie métaboliques favorisées

4321 ou inhibées lors de l'infection. Les cellules HuH7 HK4+ HK2- ayant des concentrations en
4322 ATP et ADP supérieures aux HuH7 au niveau basal, il serait également intéressant d'évaluer

- 4322 ATP et ADP supérieures aux HuH7 au niveau basal, il serait également intéressant d'évaluer
- 4323 l'évolution de ces concentrations d'adénylate dans chaque modèle suite à l'infection virale.
- 4324

4325 La seconde partie du projet était de caractériser les mécanismes moléculaires pouvant
4326 expliquer la différence de réplication du DENV observée entre les deux modèles cellulaires
4327 HuH7 et HuH7 HK4+ HK2-.

4328

4329 Comme décrit ci-dessus, de nombreuses perturbations du métabolisme de l'hôte 4330 cellulaire induites par les virus sont la conséquence directe d'une interaction entre des 4331 protéines virales et les protéines du métabolisme cellulaire.

4332 La protéine NS3 du DENV interagit avec beaucoup de protéines du métabolisme cellulaire 4333 humain (Karyala et al., 2016). Parmi les travaux publiés, il a été montré que la protéine NS3 4334 est responsable de la modulation de l'activité de plusieurs enzymes du métabolisme 4335 cellulaire dans le bus d'interférer avec le métabolisme lipidique. NS3 est capable par 4336 interaction directe avec la FAS, responsable de la biogenèse d'acides gras, de relocaliser cette 4337 enzyme depuis le cytoplasme vers les poches de réplication générées par le DENV au niveau 4338 du RER (Heaton et al., 2010). Dans le même but, elle est également capable de relocaliser et 4339 inhiber l'activité de la GAPDH permettant d'accumuler des intermédiaires réactionnels qui 4340 entrent dans le métabolisme lipidique ce qui pourrait expliquer le phénomène de stéatose 4341 observé dans le cas de développement de formes sévères chez les patients (Silva et al., 2019).

4342 Au sein de l'équipe nous avons pu identifier une nouvelle interaction entre les premières
4343 enzymes de la glycolyse, les HKs et la protéine NS3 du DENV grâce à différentes techniques.

L'analyse des conséquences de cette interaction a permis de mettre en évidence que la
protéine NS3 du DENV est suffisante pour induire l'effet type Warburg sur la glycolyse
cellulaire des cellules hépatocytaires par augmentation de la quantité de glucose consommé et
de lactate sécrété.

4348

Bien qu'aucun effet de NS3 sur l'activité HK global n'ait été mis en évidence, ces résultats doivent néanmoins être traités avec prudence. Même si la réplication semble indépendante de l'activité HK totale mesurée dans les homogénats cellulaires. Une analyse plus poussée de modification des paramètres catalytiques des enzymes induits par l'interaction directe avec la protéine virale doit être réalisée. Pour cela, il nous faudra produire NS3 et les différentes HKs en système bactérien pour analyser en système acellulaire une 4355 éventuelle modification de l'allostérie d'HK4 comme cela est observé chez certains mutants. 4356 Ce type d'approche a été réalisée par l'équipe pour la NS5A d'HCV et a montré la perte 4357 d'allostérie d'HK4 en présence de la protéine virale.

- 4358
- 4359

D'autre part la relocalisation de l'activité HK4 entre le noyau et le cytoplasme peut 4360 également avoir son importance comme le laissent suggérer les expériences utilisant GKRP.

4361 En effet, comme indiqué précédemment nous avons découvert que la protéine NS3 était 4362 capable d'interagir avec le régulateur négatif de l'HK4, GKRP.

4363 GKRP permet de réguler l'activité d'HK4 en maintenant l'enzyme en conformation ouverte 4364 (Hussain et al., 2015; Matschinsky and Wilson, 2019; Van Schaftingen, 1989), mais aussi par 4365 modification de sa localisation subcellulaire (Hussain et al., 2015; Matschinsky and Wilson, 4366 2019). NS3 ayant la capacité d'interagir avec ces deux partenaires, nous pouvons imaginer 4367 l'existence d'un complexe trimérique entre NS3, HK4 et GKRP. L'association de NS3 avec 4368 l'un ou l'autre ou bien les deux partenaires simultanément régulerait la réplication du DENV. 4369 Concernant la localisation subcellulaire, les premières expériences réalisées sembleraient 4370 indiquer que la surexpression de GKRP dans les cellules HuH7 HK4+ HK2- diminuerait la 4371 quantité de NS3 présente dans le cytoplasme. Néanmoins ces résultats doivent être confirmés 4372 n'ayant pu être reproduits suite à la crise sanitaire. La suite des travaux pourrait donc 4373 s'engager sur l'analyse précise de la localisation subcellulaire des différents partenaires en 4374 fonction des types cellulaires et des conditions de culture lors de la réplication virale.

4375 Un autre aspect à envisager est l'effet de l'expression des différents partenaires cellulaires sur 4376 l'activité de la protéine NS3. L'interaction avec l'HK4 ou GKRP pourrait moduler la 4377 disponibilité de la NS3 dans les complexes de réplication et ainsi moduler la réplication 4378 virale. A la différence des résultats obtenus dans les travaux de Silva et al., l'interaction de 4379 NS3 avec la GAPDH cellulaire montrant une augmentation de l'activité ATPasique du 4380 domaine hélicase de NS3 (Silva et al., 2019), la mesure de l'activité NS3 protéase montre que 4381 son activité n'est pas, ou de façon marginale, plus importante dans les cellules HuH7 HK4+ 4382 HK2- que les cellules HuH7. L'interaction entre HK2 ou HK4 pourrait modifier le 4383 comportement enzymatique de la protéine virale. Ces résultats restent à confirmer n'ayant pu 4384 être réalisés plusieurs fois. Si en fonction des différents partenaires cellulaires, l'activité de 4385 NS3 n'est pas modifiée, il faudra néanmoins vérifier si la localisation subcellulaire de la 4386 protéine virale n'est pas elle modifiée en fonction de l'état métabolique de la cellule et donc 4387 de la localisation subcellulaire de HK4 et GKRP.

4388 Les HKs sont également impliquées dans d'autres processus cellulaires indépendants du métabolisme comme la régulation de l'autophagie. HK2 régulerait de façon kinase-4389 4390 indépendante une autophagie protectrice des cellules permettant ainsi leur survie en cas de 4391 jeûne prolongé. Cette inhibition se fait par la fixation et inhibition de mTORC1 (mTOR 4392 complex 1), inhibiteur de l'autophagie (Roberts et al., 2014). Ainsi HK2 est directement 4393 associée à la régulation de l'autophagie. Par ailleurs, il a été montré que l'infection par le 4394 DENV induisait l'autophagie pour favoriser sa réplication (Acharya et al., 2019; Lee et al., 4395 2018; Roberts and Miyamoto, 2015). Il est possible que l'interaction entre les HKs et NS3 4396 joue spécifiquement un rôle dans l'induction du processus autophagique par le virus.

Il est intéressant de noter que la protéine NS5A d'HCV, identifiée pour interagir et contrôler
l'activité d'HK2, est également montrée, même si les mécanismes ne sont pas connus, pour
induire la mitophagie (autophagie des mitochondries) dans les cellules infectées (Jassey et al.,
2019). Ainsi on peut émettre l'hypothèse que ces deux virus du genre *Flaviviridae* cibleraient
les HKs afin de contrôler le processus autophagique favorable à leur réplication.

4402

Des perspectives d'étude seraient d'évaluer l'implication d'HK2 et HK4 dans les processus d'autophagie spécifiquement dans l'hépatocyte. Dans le contexte de l'infection par le DENV, il serait alors intéressant d'observer si l'expression de NS3 joue spécifiquement un rôle dans la régulation de l'autophagie par HK2 par exemple.

Par ailleurs, la localisation spatio-temporelle des protéines de l'hôte semble être critique pour la réplication virale depuis l'infection jusqu'à la sécrétion des néo-virions en jouant notamment sur la fonctionnalité des enzymes de l'hôte (Cook and Cristea, 2019). Il pourrait être intéressant de suivre, grâce à des techniques de suivi en temps réel, comme des analyses de microscopie confocale, l'évolution des localisations de NS3 et des HKs ainsi que GKRP entre les différents compartiments subcellulaires et d'évaluer leurs fonctions au cours du temps.

4414

En conclusion, au cours de ces travaux, nous avons pu mettre en évidence que l'expression d'HK4, l'isoenzyme normalement exprimé dans les hépatocytes, favorisait la réplication du DENV. Nous avons également pu démontrer que la régulation négative de HK4 par GKRP inhibait la réplication virale suggérant une dépendance directe de la réplication à l'activité de l'enzyme. La restauration de la lipogenèse dans les cellules HuH7 HK4+ HK2est cohérente avec les travaux récents de la littérature montrant l'induction du métabolisme lipidique pour fournir l'énergie nécessaire à la réplication du DENV. L'identification de 4422 l'interaction directe entre NS3 et les HKs ainsi que GKRP nous interroge aujourd'hui sur
4423 l'intégration complexe qu'il peut exister entre réplication virale, métabolisme
4424 glucidolipidique et interférence avec des processus de l'immunité tel que l'autophagie.

Références bibliographiques

- Acharya, B., S. Gyeltshen, W. Chaijaroenkul, and K. Na-Bangchang. 2019. Significance of
 Autophagy in Dengue Virus Infection: A Brief Review. *Am J Trop Med Hyg*.
 100:783-790.
- 4428 Acosta, E.G., V. Castilla, and E.B. Damonte. 2009. Alternative infectious entry pathways
 4429 for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol*. 11:1533-1549.
- Acosta, E.G., V. Castilla, and E.B. Damonte. 2012. Differential requirements in endocytic
 trafficking for penetration of dengue virus. *PLoS One*. 7:e44835.
- 4432 Acosta, E.G., A. Kumar, and R. Bartenschlager. 2014. Revisiting dengue virus-host cell
 4433 interaction: new insights into molecular and cellular virology. *Adv Virus Res.* 88:14434 109.
- 4435 Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G.B. Knight, and Q.X. Zhang. 1999. Hepatitis C virus and
 4436 other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc*4437 *Natl Acad Sci U S A*. 96:12766-12771.
- Aguirre, S., A.M. Maestre, S. Pagni, J.R. Patel, T. Savage, D. Gutman, K. Maringer, D. BernalRubio, R.S. Shabman, V. Simon, J.R. Rodriguez-Madoz, L.C. Mulder, G.N. Barber,
 and A. Fernandez-Sesma. 2012. DENV inhibits type I IFN production in infected
 cells by cleaving human STING. *PLoS Pathog.* 8:e1002934.
- 4442 Ainslie, G.R., Jr., J.P. Shill, and K.E. Neet. 1972. Transients and cooperativity. A slow
 4443 transition model for relating transients and cooperative kinetics of enzymes. J
 4444 Biol Chem. 247:7088-7096.
- Al-Hasani, H., M.H. Tschop, and S.W. Cushman. 2003. Two birds with one stone: novel
 glucokinase activator stimulates glucose-induced pancreatic insulin secretion
 and augments hepatic glucose metabolism. *Mol Interv.* 3:367-370.
- Alagarasu, K., T. Honap, I.M. Damle, A.P. Mulay, P.S. Shah, and D. Cecilia. 2013.
 Polymorphisms in the oligoadenylate synthetase gene cluster and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. *Infect Genet Evol*. 14:390-395.
- Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J.L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C.
 Brechot, G. Paranhos-Baccala, and V. Lotteau. 2002. Characterization of low- and
 very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol*. 76:69196928.
- Arora, K.K., C.R. Filburn, and P.L. Pedersen. 1993. Structure/function relationships in
 hexokinase. Site-directed mutational analyses and characterization of
 overexpressed fragments implicate different functions for the N- and C-terminal
 halves of the enzyme. *J Biol Chem.* 268:18259-18266.
- Arora, K.K., and P.L. Pedersen. 1988. Functional significance of mitochondrial bound
 hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation
 of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J Biol Chem*. 263:17422-17428.
- Ashour, J., M. Laurent-Rolle, P.Y. Shi, and A. Garcia-Sastre. 2009. NS5 of dengue virus
 mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol*. 83:5408-5418.
- 4464 Avirutnan, P., N. Punyadee, S. Noisakran, C. Komoltri, S. Thiemmeca, K. Auethavornanan,
 4465 A. Jairungsri, R. Kanlaya, N. Tangthawornchaikul, C. Puttikhunt, S.N.
- Pattanakitsakul, P.T. Yenchitsomanus, J. Mongkolsapaya, W. Kasinrerk, N.
 Sittisombut, M. Husmann, M. Blettner, S. Vasanawathana, S. Bhakdi, and P.
 Malasit. 2006. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role
- for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 193:10781088.
- 4471 Avirutnan, P., L. Zhang, N. Punyadee, A. Manuyakorn, C. Puttikhunt, W. Kasinrerk, P.
 4472 Malasit, J.P. Atkinson, and M.S. Diamond. 2007. Secreted NS1 of dengue virus

4473 attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and 4474 chondroitin sulfate E. PLoS Pathog. 3:e183. 4475 Azoulay-Zohar, H., A. Israelson, S. Abu-Hamad, and V. Shoshan-Barmatz. 2004. In self-4476 defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and 4477 prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. Biochem J. 377:347-355. 4478 Balsitis, S.J., J. Coloma, G. Castro, A. Alava, D. Flores, J.H. McKerrow, P.R. Beatty, and E. 4479 Harris. 2009. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral 4480 nonstructural protein 3-specific immunostaining. Am J Trop Med Hyg. 80:416-4481 424. 4482 Barclay, E. 2008. Is climate change affecting dengue in the Americas? Lancet. 371:973-4483 974. 4484 Bartenschlager, R., and S. Miller. 2008. Molecular aspects of Dengue virus replication. 4485 Future Microbiol. 3:155-165. 4486 Bartenschlager, R., F. Penin, V. Lohmann, and P. Andre. 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. Trends Microbiol. 19:95-103. 4487 4488 Bebernitz, G.R., V. Beaulieu, B.A. Dale, R. Deacon, A. Duttaroy, J. Gao, M.S. Grondine, R.C. Gupta, M. Kakmak, M. Kavana, L.C. Kirman, J. Liang, W.M. Maniara, S. Munshi, S.S. 4489 4490 Nadkarni, H.F. Schuster, T. Stams, I. St Denny, P.M. Taslimi, B. Vash, and S.L. 4491 Caplan. 2009. Investigation of functionally liver selective glucokinase activators 4492 for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem.* 52:6142-6152. 4493 Beck, C., M.A. Jimenez-Clavero, A. Leblond, B. Durand, N. Nowotny, I. Leparc-Goffart, S. 4494 Zientara, E. Jourdain, and S. Lecollinet. 2013. Flaviviruses in Europe: complex 4495 circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West 4496 Nile disease. Int J Environ Res Public Health. 10:6049-6083. 4497 Beck, C., I. Leparc-Goffart, D. Desoutter, E. Deberge, H. Bichet, S. Lowenski, M. Dumarest, 4498 G. Gonzalez, C. Migne, J. Vanhomwegen, S. Zientara, B. Durand, and S. Lecollinet. 4499 2019. Serological evidence of infection with dengue and Zika viruses in horses on 4500 French Pacific Islands. PLoS Negl Trop Dis. 13:e0007162. 4501 BeltrandelRio, H., and J.E. Wilson. 1992. Coordinated regulation of cerebral glycolytic 4502 and oxidative metabolism, mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intramitochondrially generated ATP. Arch Biochem Biophys. 4503 4504 296:667-677. 4505 Benarroch, D., B. Selisko, G.A. Locatelli, G. Maga, J.L. Romette, and B. Canard. 2004. The 4506 RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg2+-dependent and require a functional 4507 4508 Walker B motif in the helicase catalytic core. Virology. 328:208-218. Benedict, M.Q., R.S. Levine, W.A. Hawley, and L.P. Lounibos. 2007. Spread of the tiger: 4509 global risk of invasion by the mosquito Aedes albopictus. Vector Borne Zoonotic 4510 4511 Dis. 7:76-85. 4512 Bhatt, A.P., S.R. Jacobs, A.J. Freemerman, L. Makowski, J.C. Rathmell, D.P. Dittmer, and B. 4513 Damania. 2012. Dysregulation of fatty acid synthesis and glycolysis in non-4514 Hodgkin lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 109:11818-11823. 4515 Blackley, S., Z. Kou, H. Chen, M. Quinn, R.C. Rose, J.J. Schlesinger, M. Coppage, and X. Jin. 4516 2007. Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal 4517 target cells for dengue virus infection in vitro. J Virol. 81:13325-13334. 4518 Bonadonna, R.C., T. Heise, C. Arbet-Engels, C. Kapitza, A. Avogaro, J. Grimsby, J. Zhi, J.F. 4519 Grippo, and R. Balena. 2010. Piragliatin (RO4389620), a novel glucokinase 4520 activator, lowers plasma glucose both in the postabsorptive state and after a

4521 glucose challenge in patients with type 2 diabetes mellitus: a mechanistic study. J 4522 Clin Endocrinol Metab. 95:5028-5036. 4523 Brocklehurst, K.J., V.A. Payne, R.A. Davies, D. Carroll, H.L. Vertigan, H.J. Wightman, S. 4524 Aiston, I.D. Waddell, B. Leighton, M.P. Coghlan, and L. Agius. 2004. Stimulation of 4525 hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. 4526 Diabetes. 53:535-541. 4527 Brouwers, M., C. Jacobs, A. Bast, C.D.A. Stehouwer, and N.C. Schaper. 2015. Modulation of Glucokinase Regulatory Protein: A Double-Edged Sword? Trends Mol Med. 4528 4529 21:583-594. 4530 Bryan, N., and K.P. Raisch. 2015. Identification of a mitochondrial-binding site on the N-4531 terminal end of hexokinase II. Biosci Rep. 35. 4532 Bryant, N.J., R. Govers, and D.E. James. 2002. Regulated transport of the glucose 4533 transporter GLUT4. Nat Rev Mol Cell Biol. 3:267-277. Bulich, R., and J.G. Aaskov. 1992. Nuclear localization of dengue 2 virus core protein 4534 detected with monoclonal antibodies. J Gen Virol. 73 (Pt 11):2999-3003. 4535 4536 Byk, L.A., and A.V. Gamarnik. 2016. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid 4537 Protein. Annu Rev Virol. 3:263-281. 4538 Cardenas, M.L., A. Cornish-Bowden, and T. Ureta. 1998. Evolution and regulatory role of 4539 the hexokinases. Biochim Biophys Acta. 1401:242-264. 4540 Cardenas, M.L., E. Rabajille, and H. Niemeyer. 1978. Maintenance of the monomeric 4541 structure of glucokinase under reacting conditions. Arch Biochem Biophys. 4542 190:142-148. 4543 Cardenas, M.L., E. Rabajille, and H. Niemeyer. 1984a. Fructose is a good substrate for rat 4544 liver 'glucokinase' (hexokinase D). Biochem J. 222:363-370. Cardenas, M.L., E. Rabajille, and H. Niemeyer. 1984b. Suppression of kinetic 4545 4546 cooperativity of hexokinase D (glucokinase) by competitive inhibitors. A slow 4547 transition model. Eur J Biochem. 145:163-171. 4548 Cardosa, J., M.H. Ooi, P.H. Tio, D. Perera, E.C. Holmes, K. Bibi, and Z. Abdul Manap. 2009. 4549 Dengue virus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with dengue hemorrhagic fever. PLoS Negl Trop Dis. 3:e423. 4550 Carnec, X., L. Meertens, O. Dejarnac, M. Perera-Lecoin, M.L. Hafirassou, J. Kitaura, R. 4551 Ramdasi, O. Schwartz, and A. Amara. 2016. The Phosphatidylserine and 4552 4553 Phosphatidylethanolamine Receptor CD300a Binds Dengue Virus and Enhances Infection. J Virol. 90:92-102. 4554 4555 Carro, A.C., and E.B. Damonte. 2013. Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection. Virus Res. 174:78-87. 4556 Cerny, D., M. Haniffa, A. Shin, P. Bigliardi, B.K. Tan, B. Lee, M. Poidinger, E.Y. Tan, F. 4557 Ginhoux, and K. Fink. 2014. Selective susceptibility of human skin antigen 4558 4559 presenting cells to productive dengue virus infection. PLoS Pathog. 10:e1004548. 4560 Chan, C.Y.Y., J.Z.H. Low, E.S. Gan, E.Z. Ong, S.L. Zhang, H.C. Tan, X. Chai, S. Ghosh, E.E. Ooi, 4561 and K.R. Chan. 2019. Antibody-Dependent Dengue Virus Entry Modulates Cell 4562 Intrinsic Responses for Enhanced Infection. *mSphere*. 4. 4563 Chan, Y.K., and M.U. Gack. 2016. A phosphomimetic-based mechanism of dengue virus to 4564 antagonize innate immunity. Nat Immunol. 17:523-530. 4565 Chang, D.C., L.T. Hoang, A.N. Mohamed Naim, H. Dong, M.J. Schreiber, M.L. Hibberd, M.J.A. 4566 Tan, and P.Y. Shi. 2016. Evasion of early innate immune response by 2'-O-4567 methylation of dengue genomic RNA. Virology. 499:259-266.

- 4568 Chao, C.H., W.C. Wu, Y.C. Lai, P.J. Tsai, G.C. Perng, Y.S. Lin, and T.M. Yeh. 2019. Dengue
 4569 virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading
 4570 to thrombocytopenia and hemorrhage. *PLoS Pathog.* 15:e1007625.
- 4571 Chatel-Chaix, L., and R. Bartenschlager. 2014. Dengue virus- and hepatitis C virus4572 induced replication and assembly compartments: the enemy inside--caught in the
 4573 web. *J Virol.* 88:5907-5911.
- 4574 Che, P., H. Tang, and Q. Li. 2013. The interaction between claudin-1 and dengue viral
 4575 prM/M protein for its entry. *Virology*. 446:303-313.
- 4576 Chen, R.F., K.D. Yang, I.K. Lee, J.W. Liu, C.H. Huang, C.Y. Lin, Y.H. Chen, C.L. Chen, and L.
 4577 Wang. 2014. Augmented miR-150 expression associated with depressed SOCS1
 4578 expression involved in dengue haemorrhagic fever. J Infect. 69:366-374.
- 4579 Chen, Y., T. Maguire, R.E. Hileman, J.R. Fromm, J.D. Esko, R.J. Linhardt, and R.M. Marks.
 4580 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell
 4581 heparan sulfate. *Nat Med.* 3:866-871.
- 4582 Chen, Y.C., S.Y. Wang, and C.C. King. 1999. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue
 4583 virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus
 4584 entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol*. 73:2650-2657.
- Cheng, G., L. Liu, P. Wang, Y. Zhang, Y.O. Zhao, T.M. Colpitts, F. Feitosa, J.F. Anderson, and
 E. Fikrig. 2011. An in vivo transfection approach elucidates a role for Aedes
 aegypti thioester-containing proteins in flaviviral infection. *PLoS One*. 6:e22786.
- 4588 Chin, J.F., J.J. Chu, and M.L. Ng. 2007. The envelope glycoprotein domain III of dengue 4589 virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry. *Microbes Infect*. 9:1-6.
- 4590 Choi, J.M., M.H. Seo, H.H. Kyeong, E. Kim, and H.S. Kim. 2013. Molecular basis for the role
 4591 of glucokinase regulatory protein as the allosteric switch for glucokinase. *Proc*4592 *Natl Acad Sci U S A*. 110:10171-10176.
- Choi, S.G., J. Olivet, P. Cassonnet, P.O. Vidalain, K. Luck, L. Lambourne, K. Spirohn, I.
 Lemmens, M. Dos Santos, C. Demeret, L. Jones, S. Rangarajan, W. Bian, E.P.
 Coutant, Y.L. Janin, S. van der Werf, P. Trepte, E.E. Wanker, J. De Las Rivas, J.
 Tavernier, J.C. Twizere, T. Hao, D.E. Hill, M. Vidal, M.A. Calderwood, and Y. Jacob.
 2019. Maximizing binary interactome mapping with a minimal number of assays. *Nat Commun.* 10:3907.
- 4599 Chua, J.J., M.M. Ng, and V.T. Chow. 2004. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue
 4600 virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is
 4601 associated with alterations in membrane structure. *Virus Res.* 102:151-163.
- 4602 Coffey, L.L., E. Mertens, A.C. Brehin, M.D. Fernandez-Garcia, A. Amara, P. Despres, and A.
 4603 Sakuntabhai. 2009. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility.
 4604 *Microbes Infect.* 11:143-156.
- 4605 Cook, K.C., and I.M. Cristea. 2019. Location is everything: protein translocations as a viral
 4606 infection strategy. *Curr Opin Chem Biol*. 48:34-43.
- 4607 Cornish-Bowden, A., and M.L. Cardenas. 1987. Co-operativity in monomeric enzymes. J
 4608 Theor Biol. 124:1-23.
- 4609 Crane, R.K., and A. Sols. 1953. The association of hexokinase with particulate fractions of
 4610 brain and other tissue homogenates. *J Biol Chem*. 203:273-292.
- 4611 Cruz-Oliveira, C., J.M. Freire, T.M. Conceicao, L.M. Higa, M.A. Castanho, and A.T. Da Poian.
 4612 2015. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS*4613 *Microbiol Rev.* 39:155-170.
- 4614 Cuesta-Munoz, A.L., H. Huopio, T. Otonkoski, J.M. Gomez-Zumaquero, K. Nanto-Salonen, J.
 4615 Rahier, S. Lopez-Enriquez, M.A. Garcia-Gimeno, P. Sanz, F.C. Soriguer, and M.

- 4616Laakso. 2004. Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo4617glucokinase mutation. *Diabetes*. 53:2164-2168.
- 4618 Cummings, D.A., R.A. Irizarry, N.E. Huang, T.P. Endy, A. Nisalak, K. Ungchusak, and D.S.
 4619 Burke. 2004. Travelling waves in the occurrence of dengue haemorrhagic fever in
 4620 Thailand. *Nature*. 427:344-347.
- da Conceicao, T.M., N.M. Rust, A.C. Berbel, N.B. Martins, C.A. do Nascimento Santos, A.T.
 Da Poian, and L.B. de Arruda. 2013. Essential role of RIG-I in the activation of
 endothelial cells by dengue virus. *Virology*. 435:281-292.
- 4624 Dalrymple, N.A., V. Cimica, and E.R. Mackow. 2015. Dengue Virus NS Proteins Inhibit
 4625 RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus
 4626 Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *mBio*.
 4627 6:e00553-00515.
- 4628 Darnell, J.E., Jr., and H. Eagle. 1958. Glucose and glutamine in poliovirus production by
 4629 HeLa cells. *Virology*. 6:556-566.
- 4630 Davis, E.A., A. Cuesta-Munoz, M. Raoul, C. Buettger, I. Sweet, M. Moates, M.A. Magnuson,
 4631 and F.M. Matschinsky. 1999. Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and
 4632 hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental
 4633 quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia*. 42:1175-1186.
- de Chassey, B., L. Meyniel-Schicklin, A. Aublin-Gex, P. Andre, and V. Lotteau. 2012. New
 horizons for antiviral drug discovery from virus-host protein interaction
 networks. *Curr Opin Virol.* 2:606-613.
- de la Iglesia, N., M. Mukhtar, J. Seoane, J.J. Guinovart, and L. Agius. 2000. The role of the
 regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the
 hepatocyte. *J Biol Chem.* 275:10597-10603.
- 4640 De Maio, F.A., G. Risso, N.G. Iglesias, P. Shah, B. Pozzi, L.G. Gebhard, P. Mammi, E. Mancini,
 4641 M.J. Yanovsky, R. Andino, N. Krogan, A. Srebrow, and A.V. Gamarnik. 2016. The
 4642 Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates
 4643 Splicing. *PLoS Pathog.* 12:e1005841.
- 4644 De Nova-Ocampo, M., N. Villegas-Sepulveda, and R.M. del Angel. 2002. Translation
 4645 elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of
 4646 dengue 4 virus RNA. *Virology*. 295:337-347.
- 4647 De Vos, A., H. Heimberg, E. Quartier, P. Huypens, L. Bouwens, D. Pipeleers, and F. Schuit.
 4648 1995. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in
 4649 glucokinase gene expression. *J Clin Invest*. 96:2489-2495.
- 4650 Dejarnac, O., M.L. Hafirassou, M. Chazal, M. Versapuech, J. Gaillard, M. Perera-Lecoin, C.
 4651 Umana-Diaz, L. Bonnet-Madin, X. Carnec, J.Y. Tinevez, C. Delaugerre, O. Schwartz,
 4652 P. Roingeard, N. Jouvenet, C. Berlioz-Torrent, L. Meertens, and A. Amara. 2018.
 4653 TIM-1 Ubiquitination Mediates Dengue Virus Entry. *Cell Rep.* 23:1779-1793.
- 4654 Delgado, T., P.A. Carroll, A.S. Punjabi, D. Margineantu, D.M. Hockenbery, and M. Lagunoff.
 4655 2010. Induction of the Warburg effect by Kaposi's sarcoma herpesvirus is
 4656 required for the maintenance of latently infected endothelial cells. *Proc Natl Acad*4657 Sci U S A. 107:10696-10701.
- 4658den Boon, J.A., and P. Ahlquist. 2010. Organelle-like membrane compartmentalization of4659positive-strand RNA virus replication factories. Annu Rev Microbiol. 64:241-256.
- 4660 Dentin, R., P.D. Denechaud, F. Benhamed, J. Girard, and C. Postic. 2006. Hepatic gene
 4661 regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr.*4662 136:1145-1149.
- 4663 DeWaal, D., V. Nogueira, A.R. Terry, K.C. Patra, S.M. Jeon, G. Guzman, J. Au, C.P. Long, M.R.
 4664 Antoniewicz, and N. Hay. 2018. Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and

- induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes tometformin. *Nat Commun.* 9:446.
- 4667 Diamond, M.S., T.G. Roberts, D. Edgil, B. Lu, J. Ernst, and E. Harris. 2000. Modulation of
 4668 Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. J
 4669 Virol. 74:4957-4966.
- 4670 Dipietro, D.L., C. Sharma, and S. Weinhouse. 1962. Studies on glucose phosphorylation in
 4671 rat liver. *Biochemistry*. 1:455-462.
- 4672 Dorbani, L., V. Jancsik, M. Linden, J.F. Leterrier, B.D. Nelson, and A. Rendon. 1987.
 4673 Subfractionation of the outer membrane of rat brain mitochondria: evidence for
 4674 the existence of a domain containing the porin-hexokinase complex. *Arch*4675 *Biochem Biophys.* 252:188-196.
- 4676 Douam, F., D. Lavillette, and F.L. Cosset. 2015. The mechanism of HCV entry into host
 4677 cells. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 129:63-107.
- 4678 Dreux, M., V.L. Dao Thi, J. Fresquet, M. Guerin, Z. Julia, G. Verney, D. Durantel, F. Zoulim,
 4679 D. Lavillette, F.L. Cosset, and B. Bartosch. 2009. Receptor complementation and
 4680 mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply
 4681 its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog.* 5:e1000310.
- 4682 Duarte dos Santos, C.N., M.P. Frenkiel, M.P. Courageot, C.F. Rocha, M.C. Vazeille-Falcoz,
 4683 M.W. Wien, F.A. Rey, V. Deubel, and P. Despres. 2000. Determinants in the
 4684 envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of
 4685 apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology*. 274:2924686 308.
- 4687 El Sahili, A., and J. Lescar. 2017. Dengue Virus Non-Structural Protein 5. *Viruses*. 9.
- Estofolete, C.F., M.T. de Oliveira Mota, A.C. Bernardes Terzian, B.H.G. de Aguiar Milhim,
 M.R. Ribeiro, D.V. Nunes, M.P. Mourao, S.L. Rossi, M.L. Nogueira, and N. Vasilakis.
 2019. Unusual clinical manifestations of dengue disease Real or imagined? *Acta Trop.* 199:105134.
- Falgout, B., M. Pethel, Y.M. Zhang, and C.J. Lai. 1991. Both nonstructural proteins NS2B
 and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus
 nonstructural proteins. *J Virol*. 65:2467-2475.
- Fang, Y.T., S.W. Wan, Y.T. Lu, J.H. Yao, C.F. Lin, L.J. Hsu, M.G. Brown, J.S. Marshall, R.
 Anderson, and Y.S. Lin. 2014. Autophagy facilitates antibody-enhanced dengue
 virus infection in human pre-basophil/mast cells. *PLoS One*. 9:e110655.
- Faustino, A.F., F.A. Carvalho, I.C. Martins, M.A. Castanho, R. Mohana-Borges, F.C. Almeida,
 A.T. Da Poian, and N.C. Santos. 2014. Dengue virus capsid protein interacts
 specifically with very low-density lipoproteins. *Nanomedicine*. 10:247-255.
- Favard, C., J. Chojnacki, P. Merida, N. Yandrapalli, J. Mak, C. Eggeling, and D. Muriaux.
 2019. HIV-1 Gag specifically restricts PI(4,5)P2 and cholesterol mobility in living cells creating a nanodomain platform for virus assembly. *Sci Adv.* 5:eaaw8651.
- Fernandes-Siqueira, L.O., J.D. Zeidler, B.G. Sousa, T. Ferreira, and A.T. Da Poian. 2018.
 Anaplerotic Role of Glucose in the Oxidation of Endogenous Fatty Acids during
 Dengue Virus Infection. *mSphere*. 3.
- Fernandez-Garcia, M.D., M. Mazzon, M. Jacobs, and A. Amara. 2009. Pathogenesis of
 flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 5:318328.
- Fontaine, K.A., E.L. Sanchez, R. Camarda, and M. Lagunoff. 2015. Dengue virus induces
 and requires glycolysis for optimal replication. *J Virol*. 89:2358-2366.

4712 Franco, L., G. Palacios, J.A. Martinez, A. Vazquez, N. Savji, F. De Ory, M.P. Sanchez-Seco, D. 4713 Martin, W.I. Lipkin, and A. Tenorio. 2011. First report of sylvatic DENV-2associated dengue hemorrhagic fever in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 5:e1251. 4714 4715 Frieden, C. 1970. Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The hysteretic 4716 enzyme concept. J Biol Chem. 245:5788-5799. 4717 Froguel, P., M. Vaxillaire, F. Sun, G. Velho, H. Zouali, M.O. Butel, S. Lesage, N. Vionnet, K. 4718 Clement, F. Fougerousse, and et al. 1992. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 4719 4720 356:162-164. Froguel, P., H. Zouali, N. Vionnet, G. Velho, M. Vaxillaire, F. Sun, S. Lesage, M. Stoffel, J. 4721 Takeda, P. Passa, and et al. 1993. Familial hyperglycemia due to mutations in 4722 4723 glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. N Engl J Med. 328:697-4724 702. 4725 Fujimoto, T., Y. Ohsaki, J. Cheng, M. Suzuki, and Y. Shinohara. 2008. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol*. 130:263-279. 4726 4727 Galan, M., O. Vincent, I. Roncero, S. Azriel, P. Boix-Pallares, E. Delgado-Alvarez, F. Diaz-Cadorniga, E. Blazquez, and M.A. Navas. 2006. Effects of novel maturity-onset 4728 4729 diabetes of the young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and 4730 protein stability. Biochem J. 393:389-396. 4731 Gao, F., X. Duan, X. Lu, Y. Liu, L. Zheng, Z. Ding, and J. Li. 2010. Novel binding between 4732 pre-membrane protein and claudin-1 is required for efficient dengue virus entry. 4733 Biochem Biophys Res Commun. 391:952-957. 4734 Gebhard, L.G., N.G. Iglesias, L.A. Byk, C.V. Filomatori, F.A. De Maio, and A.V. Gamarnik. 4735 2016. A Proline-Rich N-Terminal Region of the Dengue Virus NS3 Is Crucial for 4736 Infectious Particle Production. J Virol. 90:5451-5461. 4737 Glingston, R.S., R. Deb, S. Kumar, and S. Nagotu. 2019. Organelle dynamics and viral 4738 infections: at cross roads. *Microbes Infect*. 21:20-32. 4739 Gloyn, A.L. 2003. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-4740 onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia 4741 of infancy. Hum Mutat. 22:353-362. 4742 Goic, B., K.A. Stapleford, L. Frangeul, A.J. Doucet, V. Gausson, H. Blanc, N. Schemmel-Jofre, G. Cristofari, L. Lambrechts, M. Vignuzzi, and M.C. Saleh. 2016. Virus-derived DNA 4743 4744 drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. Nat Commun. 7:12410. 4745 Gonzalez, C., T. Ureta, J. Babul, E. Rabajille, and H. Niemeyer. 1967. Characterization of 4746 isoenzymes of adenosine triphosphate: D-hexose 6-phosphotransferase from rat 4747 liver. Biochemistry. 6:460-468. Gonzalez, C., T. Ureta, R. Sanchez, and H. Niemeyer. 1964. Multiple molecular forms of 4748 4749 ATP:hexose 6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 4750 16:347-352. 4751 Goodwin, C.M., S. Xu, and J. Munger. 2015. Stealing the Keys to the Kitchen: Viral 4752 Manipulation of the Host Cell Metabolic Network. Trends Microbiol. 23:789-798. 4753 Gopala Reddy, S.B., W.X. Chin, and N.S. Shivananju. 2018. Dengue virus NS2 and NS4: 4754 Minor proteins, mammoth roles. *Biochem Pharmacol*. 154:54-63. 4755 Gould, G.W., and G.I. Bell. 1990. Facilitative glucose transporters: an expanding family. 4756 Trends Biochem Sci. 15:18-23. 4757 Gregoriou, M., I.P. Trayer, and A. Cornish-Bowden. 1981. Isotope-exchange evidence for 4758 an ordered mechanism for rat-liver glucokinase, a monomeric cooperative 4759 enzyme. Biochemistry. 20:499-506.

- 4760 Grief, C., R. Galler, L.M. Cortes, and O.M. Barth. 1997. Intracellular localisation of dengue4761 2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic in situ hybridisation.
 4762 Arch Virol. 142:2347-2357.
- Griffin, L.D., B.D. Gelb, D.A. Wheeler, D. Davison, V. Adams, and E.R. McCabe. 1991.
 Mammalian hexokinase 1: evolutionary conservation and structure to function analysis. *Genomics*. 11:1014-1024.
- Grimsby, J., R. Sarabu, W.L. Corbett, N.E. Haynes, F.T. Bizzarro, J.W. Coffey, K.R. Guertin,
 D.W. Hilliard, R.F. Kester, P.E. Mahaney, L. Marcus, L. Qi, C.L. Spence, J. Tengi, M.A.
 Magnuson, C.A. Chu, M.T. Dvorozniak, F.M. Matschinsky, and J.F. Grippo. 2003.
 Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science*.
 301:370-373.
- 4771 Gubler, D.J. 1998a. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 11:4804772 496.
- 4773 Gubler, D.J. 1998b. Epidemic Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: A global Public Health
 4774 Problem in the 21st century. *Emerging Infections*
- 4775
- Gubler, D.J., P. Reiter, K.L. Ebi, W. Yap, R. Nasci, and J.A. Patz. 2001. Climate variability
 and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne
 diseases. *Environ Health Perspect*. 109 Suppl 2:223-233.
- Gubler, D.J., and L. Rosen. 1977. Quantitative aspects of replication of dengue viruses in
 Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) after oral and parenteral infection. *J Med Entomol.* 13:469-472.
- 4782 Guo, Y., K.R. Cordes, R.V. Farese, Jr., and T.C. Walther. 2009. Lipid droplets at a glance. J
 4783 Cell Sci. 122:749-752.
- 4784 Guzman, M.G., M. Alvarez, and S.B. Halstead. 2013. Secondary infection as a risk factor
 4785 for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective
 4786 and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 158:14454787 1459.
- 4788 Guzman, M.G., and E. Harris. 2015. Dengue. *Lancet*. 385:453-465.
- Hafirassou, M.L., L. Meertens, C. Umana-Diaz, A. Labeau, O. Dejarnac, L. Bonnet-Madin,
 B.M. Kummerer, C. Delaugerre, P. Roingeard, P.O. Vidalain, and A. Amara. 2017. A
 Global Interactome Map of the Dengue Virus NS1 Identifies Virus Restriction and
 Dependency Host Factors. *Cell Rep.* 21:3900-3913.
- Halsey, E.S., M.A. Marks, E. Gotuzzo, V. Fiestas, L. Suarez, J. Vargas, N. Aguayo, C. Madrid,
 C. Vimos, T.J. Kochel, and V.A. Laguna-Torres. 2012. Correlation of serotypespecific dengue virus infection with clinical manifestations. *PLoS Negl Trop Dis*.
 6:e1638.
- Halstead, S.B., J.S. Chow, and N.J. Marchette. 1973. Immunological enhancement of
 dengue virus replication. *Nat New Biol*. 243:24-26.
- Halstead, S.B., and E.J. O'Rourke. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I.
 Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med*. 146:201-217.
- Hanley, K.A., T.P. Monath, S.C. Weaver, S.L. Rossi, R.L. Richman, and N. Vasilakis. 2013.
 Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific
 competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles
 of dengue virus and yellow fever virus. *Infect Genet Evol*. 19:292-311.
- Hattersley, A.T., R.C. Turner, M.A. Permutt, P. Patel, Y. Tanizawa, K.C. Chiu, S. O'Rahilly,
 P.J. Watkins, and J.S. Wainscoat. 1992. Linkage of type 2 diabetes to the
 glucokinase gene. *Lancet*. 339:1307-1310.
- He, Z., X. Zhu, W. Wen, J. Yuan, Y. Hu, J. Chen, S. An, X. Dong, C. Lin, J. Yu, J. Wu, Y. Yang, J.
 Cai, J. Li, and M. Li. 2016. Dengue Virus Subverts Host Innate Immunity by
 Targeting Adaptor Protein MAVS. *J Virol*. 90:7219-7230.
- Heaton, N.S., R. Perera, K.L. Berger, S. Khadka, D.J. Lacount, R.J. Kuhn, and G. Randall.
 2010. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to
 sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:17345-17350.
- 4815 Heaton, N.S., and G. Randall. 2010. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid
 4816 metabolism. *Cell Host Microbe*. 8:422-432.
- 4817 Heaton, N.S., and G. Randall. 2011. Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends* 4818 *Microbiol.* 19:368-375.
- 4819 Herker, E., C. Harris, C. Hernandez, A. Carpentier, K. Kaehlcke, A.R. Rosenberg, R.V.
 4820 Farese, Jr., and M. Ott. 2010. Efficient hepatitis C virus particle formation requires 4821 diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med.* 16:1295-1298.
- Hoenen, A., W. Liu, G. Kochs, A.A. Khromykh, and J.M. Mackenzie. 2007. West Nile virusinduced cytoplasmic membrane structures provide partial protection against the
 interferon-induced antiviral MxA protein. *J Gen Virol*. 88:3013-3017.
- 4825 Holmes, E.C., and S.S. Twiddy. 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of
 4826 dengue virus. *Infect Genet Evol*. 3:19-28.
- 4827 Hoppe-Seyler, K., A. Honegger, F. Bossler, J. Sponagel, J. Bulkescher, C. Lohrey, and F.
 4828 Hoppe-Seyler. 2017. Viral E6/E7 oncogene and cellular hexokinase 2 expression 4829 in HPV-positive cancer cell lines. *Oncotarget*. 8:106342-106351.
- 4830 Hotta, S. 1952. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and
 4831 modification of the virus. *J Infect Dis.* 90:1-9.
- Huang, M., S. Lu, T. Shi, Y. Zhao, Y. Chen, X. Li, X. Liu, Z. Huang, and J. Zhang. 2013.
 Conformational transition pathway in the activation process of allosteric glucokinase. *PLoS One*. 8:e55857.
- Huang, Y.J., S. Higgs, K.M. Horne, and D.L. Vanlandingham. 2014. Flavivirus-mosquito
 interactions. *Viruses*. 6:4703-4730.
- Huerre, M.R., N.T. Lan, P. Marianneau, N.B. Hue, H. Khun, N.T. Hung, N.T. Khen, M.T.
 Drouet, V.T. Huong, D.Q. Ha, Y. Buisson, and V. Deubel. 2001. Liver histopathology
 and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese
 children. *Virchows Arch*. 438:107-115.
- Hung, J.J., M.T. Hsieh, M.J. Young, C.L. Kao, C.C. King, and W. Chang. 2004. An external
 loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in
 serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol*. 78:378388.
- Hussain, S., E. Richardson, Y. Ma, C. Holton, I. De Backer, N. Buckley, W. Dhillo, G. Bewick,
 S. Zhang, D. Carling, S. Bloom, and J. Gardiner. 2015. Glucokinase activity in the
 arcuate nucleus regulates glucose intake. *J Clin Invest*. 125:337-349.
- 4848 Iglesias, N.G., J.A. Mondotte, L.A. Byk, F.A. De Maio, M.M. Samsa, C. Alvarez, and A.V.
 4849 Gamarnik. 2015. Dengue Virus Uses a Non-Canonical Function of the Host GBF14850 Arf-COPI System for Capsid Protein Accumulation on Lipid Droplets. *Traffic*.
 4851 16:962-977.
- 4852 Irwin, D.M., and H. Tan. 2008. Molecular evolution of the vertebrate hexokinase gene
 4853 family: Identification of a conserved fifth vertebrate hexokinase gene. *Comp*4854 *Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 3:96-107.
- 4855 Iynedjian, P.B. 2009. Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci.*4856 66:27-42.

- Jarmer, J., J. Zlatkovic, G. Tsouchnikas, O. Vratskikh, J. Strauss, J.H. Aberle, V. Chmelik, M.
 Kundi, K. Stiasny, and F.X. Heinz. 2014. Variation of the specificity of the human
 antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination. J *Virol.* 88:13845-13857.
- Jassey, A., C.H. Liu, C.A. Changou, C.D. Richardson, H.Y. Hsu, and L.T. Lin. 2019. Hepatitis
 C Virus Non-Structural Protein 5A (NS5A) Disrupts Mitochondrial Dynamics and
 Induces Mitophagy. *Cells*. 8.
- Jin, L., T. Guo, Z. Li, Z. Lei, H. Li, Y. Mao, X. Wang, N. Zhou, Y. Zhang, R. Hu, X. Zhang, G. Niu,
 D.M. Irwin, and H. Tan. 2015. Role of glucokinase in the subcellular localization of
 glucokinase regulatory protein. *Int J Mol Sci.* 16:7377-7393.
- Jindadamrongwech, S., C. Thepparit, and D.R. Smith. 2004. Identification of GRP 78 (BiP)
 as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol*.
 149:915-927.
- Johari, N.A., K. Voon, S.Y. Toh, L.H. Sulaiman, I.K.S. Yap, and P.K.C. Lim. 2019. Sylvatic
 dengue virus type 4 in Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes in an
 urban setting in Peninsular Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis.* 13:e0007889.
- Johnson, D., R.M. Shepherd, D. Gill, T. Gorman, D.M. Smith, and M.J. Dunne. 2007.
 Glucokinase activators: molecular tools for studying the physiology of insulinsecreting cells. *Biochem Soc Trans*. 35:1208-1210.
- Johnson, N., M. Fernandez de Marco, A. Giovannini, C. Ippoliti, M.L. Danzetta, G. Svartz, O.
 Erster, M.H. Groschup, U. Ziegler, A. Mirazimi, V. Monteil, C. Beck, G. Gonzalez, S.
 Lecollinet, H. Attoui, and S. Moutailler. 2018. Emerging Mosquito-Borne Threats
 and the Response from European and Eastern Mediterranean Countries. *Int J Environ Res Public Health*. 15.
- Jordan, T.X., and G. Randall. 2017. Dengue Virus Activates the AMP Kinase-mTOR Axis To
 Stimulate a Proviral Lipophagy. *J Virol*. 91.
- Kabashima, T., T. Kawaguchi, B.E. Wadzinski, and K. Uyeda. 2003. Xylulose 5-phosphate
 mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein
 phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:5107-5112.
- Kakumani, P.K., S.S. Ponia, R.K. S, V. Sood, M. Chinnappan, A.C. Banerjea, G.R. Medigeshi,
 P. Malhotra, S.K. Mukherjee, and R.K. Bhatnagar. 2013. Role of RNA interference
 (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi
 suppressor. J Virol. 87:8870-8883.
- Kakumani, P.K., K.S. Rajgokul, S.S. Ponia, I. Kaur, S. Mahanty, G.R. Medigeshi, A.C.
 Banerjea, A.P. Chopra, P. Malhotra, S.K. Mukherjee, and R.K. Bhatnagar. 2015.
 Dengue NS3, an RNAi suppressor, modulates the human miRNA pathways
 through its interacting partner. *Biochem J*. 471:89-99.
- Kamata, K., M. Mitsuya, T. Nishimura, J. Eiki, and Y. Nagata. 2004. Structural basis for
 allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure*. 12:429-438.
- 4897 Karyala, P., R. Metri, C. Bathula, S.K. Yelamanchi, L. Sahoo, S. Arjunan, N.P. Sastri, and N.
 4898 Chandra. 2016. DenHunt A Comprehensive Database of the Intricate Network of
 4899 Dengue-Human Interactions. *PLoS Negl Trop Dis.* 10:e0004965.
- Kasai, F., N. Hirayama, M. Ozawa, M. Satoh, and A. Kohara. 2018. HuH-7 reference
 genome profile: complex karyotype composed of massive loss of heterozygosity. *Hum Cell*. 31:261-267.
- Katzen, H.M., and R.T. Schimke. 1965. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue
 distribution, age dependency, and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 54:12181225.

- Kavanagh Williamson, M., N. Coombes, F. Juszczak, M. Athanasopoulos, M.B. Khan, T.R.
 Eykyn, U. Srenathan, L.S. Taams, J. Dias Zeidler, A.T. Da Poian, and H. Huthoff.
 2018. Upregulation of Glucose Uptake and Hexokinase Activity of Primary Human
 CD4+ T Cells in Response to Infection with HIV-1. *Viruses*. 10.
- Klema, V.J., R. Padmanabhan, and K.H. Choi. 2015. Flaviviral Replication Complex:
 Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses*. 7:4640-4656.
- Kostyuchenko, V.A., Q. Zhang, J.L. Tan, T.S. Ng, and S.M. Lok. 2013. Immature and mature
 dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process. *J Virol.* 87:7700-7707.
- Kottke, M., V. Adam, I. Riesinger, G. Bremm, W. Bosch, D. Brdiczka, G. Sandri, and E.
 Panfili. 1988. Mitochondrial boundary membrane contact sites in brain: points of hexokinase and creatine kinase location, and control of Ca2+ transport. *Biochim Biophys Acta*. 935:87-102.
- Kuhn, R.J., W. Zhang, M.G. Rossmann, S.V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C.T. Jones, S.
 Mukhopadhyay, P.R. Chipman, E.G. Strauss, T.S. Baker, and J.H. Strauss. 2002.
 Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 108:717-725.
- 4923Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen recognition by the innate immune4924system. Int Rev Immunol. 30:16-34.
- 4925 Landini, M.P. 1984. Early enhanced glucose uptake in human cytomegalovirus-infected
 4926 cells. *J Gen Virol*. 65 (Pt 7):1229-1232.
- 4927 Larion, M., A.L. Hansen, F. Zhang, L. Bruschweiler-Li, V. Tugarinov, B.G. Miller, and R.
 4928 Bruschweiler. 2015. Kinetic Cooperativity in Human Pancreatic Glucokinase
 4929 Originates from Millisecond Dynamics of the Small Domain. *Angew Chem Int Ed*4930 *Engl.* 54:8129-8132.
- 4931 Larion, M., and B.G. Miller. 2012. Homotropic allosteric regulation in monomeric 4932 mammalian glucokinase. *Arch Biochem Biophys*. 519:103-111.
- 4933Lavie, M., and J. Dubuisson. 2017. Interplay between hepatitis C virus and lipid4934metabolism during virus entry and assembly. *Biochimie*. 141:62-69.
- 4935 Lazear, H.M., J.W. Schoggins, and M.S. Diamond. 2019. Shared and Distinct Functions of
 4936 Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 50:907-923.
- 4937 Lee, A.J., and A.A. Ashkar. 2018. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front*4938 *Immunol.* 9:2061.
- Lee, Y.R., S.H. Kuo, C.Y. Lin, P.J. Fu, Y.S. Lin, T.M. Yeh, and H.S. Liu. 2018. Dengue virusinduced ER stress is required for autophagy activation, viral replication, and
 pathogenesis both in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 8:489.
- Lee, Y.R., H.Y. Lei, M.T. Liu, J.R. Wang, S.H. Chen, Y.F. Jiang-Shieh, Y.S. Lin, T.M. Yeh, C.C.
 Liu, and H.S. Liu. 2008. Autophagic machinery activated by dengue virus
 enhances virus replication. *Virology*. 374:240-248.
- Lescar, J., D. Luo, T. Xu, A. Sampath, S.P. Lim, B. Canard, and S.G. Vasudevan. 2008.
 Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the
 multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res.* 80:94101.
- Li, H., S. Clum, S. You, K.E. Ebner, and R. Padmanabhan. 1999. The serine protease and
 RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains
 of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol.*73:3108-3116.

- Li, J., R. Huang, W. Liao, Z. Chen, S. Zhang, and R. Huang. 2012. Dengue virus utilizes
 calcium modulating cyclophilin-binding ligand to subvert apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 418:622-627.
- Li, J., S.P. Lim, D. Beer, V. Patel, D. Wen, C. Tumanut, D.C. Tully, J.A. Williams, J. Jiricek, J.P.
 Priestle, J.L. Harris, and S.G. Vasudevan. 2005. Functional profiling of
 recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using
 tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. *J Biol Chem.* 280:28766-28774.
- Li, L., S.M. Lok, I.M. Yu, Y. Zhang, R.J. Kuhn, J. Chen, and M.G. Rossmann. 2008. The
 flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and
 maturation. *Science*. 319:1830-1834.
- Li, Y., Y.M. Kim, J. Zou, Q.Y. Wang, S. Gayen, Y.L. Wong, T. Lee le, X. Xie, Q. Huang, J. Lescar,
 P.Y. Shi, and C. Kang. 2015. Secondary structure and membrane topology of
 dengue virus NS4B N-terminal 125 amino acids. *Biochim Biophys Acta*.
 1848:3150-3157.
- Liang, Z., S. Wu, Y. Li, L. He, M. Wu, L. Jiang, L. Feng, P. Zhang, and X. Huang. 2011.
 Activation of Toll-like receptor 3 impairs the dengue virus serotype 2 replication through induction of IFN-beta in cultured hepatoma cells. *PLoS One*. 6:e23346.
- Lim, S.P., C.G. Noble, and P.Y. Shi. 2015. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Res.* 119:57-67.
- Lin, S.X., and K.E. Neet. 1990. Demonstration of a slow conformational change in liver
 glucokinase by fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem*. 265:9670-9675.
- 4974 Lindenbach, B.D., and C.M. Rice. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.*4975 59:23-61.
- Liu, Q., Y. Shen, S. Liu, J. Weng, and J. Liu. 2011. Crystal structure of E339K mutated
 human glucokinase reveals changes in the ATP binding site. *FEBS Lett.* 585:11751179.
- 4979 Lopez-Denman, A.J., and J.M. Mackenzie. 2017. The IMPORTance of the Nucleus during
 4980 Flavivirus Replication. *Viruses*. 9.
- Lozach, P.Y., L. Burleigh, I. Staropoli, E. Navarro-Sanchez, J. Harriague, J.L. Virelizier, F.A.
 Rey, P. Despres, F. Arenzana-Seisdedos, and A. Amara. 2005. Dendritic cellspecific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN
 internalization signals. *J Biol Chem.* 280:23698-23708.
- Ludvik, A.E., C.M. Pusec, M. Priyadarshini, A.R. Angueira, C. Guo, A. Lo, K.S. Hershenhouse,
 G.Y. Yang, X. Ding, T.E. Reddy, W.L. Lowe, Jr., and B.T. Layden. 2016. HKDC1 Is a
 Novel Hexokinase Involved in Whole-Body Glucose Use. *Endocrinology*.
 157:3452-3461.
- Luo, D., N. Wei, D.N. Doan, P.N. Paradkar, Y. Chong, A.D. Davidson, M. Kotaka, J. Lescar,
 and S.G. Vasudevan. 2010. Flexibility between the protease and helicase domains
 of the dengue virus NS3 protein conferred by the linker region and its functional
 implications. *J Biol Chem.* 285:18817-18827.
- Luo, D., T. Xu, C. Hunke, G. Gruber, S.G. Vasudevan, and J. Lescar. 2008a. Crystal structure
 of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol*. 82:173-183.
- Luo, D., T. Xu, R.P. Watson, D. Scherer-Becker, A. Sampath, W. Jahnke, S.S. Yeong, C.H.
 Wang, S.P. Lim, A. Strongin, S.G. Vasudevan, and J. Lescar. 2008b. Insights into
 RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *EMBO J.*27:3209-3219.
- Luplertlop, N., P. Surasombatpattana, S. Patramool, E. Dumas, L. Wasinpiyamongkol, L.
 Saune, R. Hamel, E. Bernard, D. Sereno, F. Thomas, D. Piquemal, H. Yssel, L. Briant,

- and D. Misse. 2011. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum
 of pathogens in the Aedes aegypti salivary gland, following Infection with Dengue
 Virus. *PLoS Pathog*. 7:e1001252.
 Ma, D.Y., and M.S. Suthar. 2015. Mechanisms of innate immune evasion in re-emerging
- 5006 RNA viruses. *Curr Opin Virol*. 12:26-37.
- Mackenzie, J.M., A.A. Khromykh, and R.G. Parton. 2007. Cholesterol manipulation by
 West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe*. 2:229239.
- Magnuson, M.A. 1990. Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular
 genetic studies. *Diabetes*. 39:523-527.
- Magnuson, M.A. 1992. Tissue-specific regulation of glucokinase gene expression. *J Cell Biochem.* 48:115-121.
- Majewski, N., V. Nogueira, P. Bhaskar, P.E. Coy, J.E. Skeen, K. Gottlob, N.S. Chandel, C.B.
 Thompson, R.B. Robey, and N. Hay. 2004. Hexokinase-mitochondria interaction
 mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of
 Bax and Bak. *Mol Cell*. 16:819-830.
- Makino, Y., M. Tadano, T. Anzai, S.P. Ma, S. Yasuda, and T. Fukunaga. 1989. Detection of
 dengue 4 virus core protein in the nucleus. II. Antibody against dengue 4 core
 protein produced by a recombinant baculovirus reacts with the antigen in the
 nucleus. *J Gen Virol*. 70 (Pt 6):1417-1425.
- Malet, H., N. Masse, B. Selisko, J.L. Romette, K. Alvarez, J.C. Guillemot, H. Tolou, T.L. Yap, S.
 Vasudevan, J. Lescar, and B. Canard. 2008. The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Antiviral Res.* 80:23-35.
- 5025Marie, C., and J. Bralet. 1991. Blood glucose level and morphological brain damage5026following cerebral ischemia. Cerebrovasc Brain Metab Rev. 3:29-38.
- Martinez-Ramirez, I., A. Carrillo-Garcia, A. Contreras-Paredes, E. Ortiz-Sanchez, A. Cruz Gregorio, and M. Lizano. 2018. Regulation of Cellular Metabolism by High-Risk
 Human Papillomaviruses. *Int J Mol Sci.* 19.
- Mateo, R., C.M. Nagamine, J. Spagnolo, E. Mendez, M. Rahe, M. Gale, Jr., J. Yuan, and K.
 Kirkegaard. 2013. Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion
 maturation. *J Virol.* 87:1312-1321.
- 5033Matschinsky, F.M. 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in
pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes*. 39:647-652.
- 5035 Matschinsky, F.M. 2009. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes
 5036 therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 8:399-416.
- 5037 Matschinsky, F.M., and D.F. Wilson. 2019. The Central Role of Glucokinase in Glucose
 5038 Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the
 5039 Enzyme in Islets of Langerhans. *Front Physiol*. 10:148.
- Mazine, C.A., M.L. Macoris, M.T. Andrighetti, S. Yasumaro, M.E. Silva, M.J. Nelson, and P.J.
 Winch. 1996. Disposable containers as larval habitats for Aedes aegypti in a city
 with regular refuse collection: a study in Marilia, Sao Paulo State, Brazil. *Acta Trop.* 62:1-13.
- McArdle, J., N.J. Moorman, and J. Munger. 2012. HCMV targets the metabolic stress
 response through activation of AMPK whose activity is important for viral
 replication. *PLoS Pathog.* 8:e1002502.
- McArdle, J., X.L. Schafer, and J. Munger. 2011. Inhibition of calmodulin-dependent kinase
 kinase blocks human cytomegalovirus-induced glycolytic activation and severely
 attenuates production of viral progeny. *J Virol.* 85:705-714.

- Meertens, L., X. Carnec, M.P. Lecoin, R. Ramdasi, F. Guivel-Benhassine, E. Lew, G. Lemke,
 O. Schwartz, and A. Amara. 2012. The TIM and TAM families of
 phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe*.
 12:544-557.
- Mehta, T.K., and P.D. Shah. 2018. Identification of prevalent dengue serotypes by reverse
 transcriptase polymerase chain reaction and correlation with severity of dengue
 as per the recent World Health Organization classification (2009). *Indian J Med Microbiol.* 36:273-278.
- Meininger, G.E., R. Scott, M. Alba, Y. Shentu, E. Luo, H. Amin, M.J. Davies, K.D. Kaufman,
 and B.J. Goldstein. 2011. Effects of MK-0941, a novel glucokinase activator, on
 glycemic control in insulin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*.
 34:2560-2566.
- 5062Meyniel-Schicklin, L., B. de Chassey, P. Andre, and V. Lotteau. 2012. Viruses and5063interactomes in translation. *Mol Cell Proteomics*. 11:M111 014738.
- Miller, J.L., B.J. de Wet, L. Martinez-Pomares, C.M. Radcliffe, R.A. Dwek, P.M. Rudd, and S.
 Gordon. 2008. The mannose receptor mediates dengue virus infection of
 macrophages. *PLoS Pathog.* 4:e17.
- 5067Miller, S., S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Buhler, and R. Bartenschlager. 2007. The non-5068structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing5069membrane alterations in a 2K-regulated manner. J Biol Chem. 282:8873-8882.
- 5070 Miller, S., and J. Krijnse-Locker. 2008. Modification of intracellular membrane structures
 5071 for virus replication. *Nat Rev Microbiol*. 6:363-374.
- 5072 Mitsuya, M., K. Kamata, M. Bamba, H. Watanabe, Y. Sasaki, K. Sasaki, S. Ohyama, H.
 5073 Hosaka, Y. Nagata, J. Eiki, and T. Nishimura. 2009. Discovery of novel 3,65074 disubstituted 2-pyridinecarboxamide derivatives as GK activators. *Bioorg Med*5075 *Chem Lett.* 19:2718-2721.
- Modhiran, N., D. Watterson, A. Blumenthal, A.G. Baxter, P.R. Young, and K.J. Stacey. 2017.
 Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunol Cell Biol*. 95:491-495.
- Modhiran, N., D. Watterson, D.A. Muller, A.K. Panetta, D.P. Sester, L. Liu, D.A. Hume, K.J.
 Stacey, and P.R. Young. 2015. Dengue virus NS1 protein activates cells via Tolllike receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med.*7:304ra142.
- 5083Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S.C. Harrison. 2005. Variable surface epitopes in the5084crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. J Virol. 79:1223-50851231.
- 5086Mohan, B., A.K. Patwari, and V.K. Anand. 2000. Hepatic dysfunction in childhood dengue5087infection. J Trop Pediatr. 46:40-43.
- Molina, S., V. Castet, C. Fournier-Wirth, L. Pichard-Garcia, R. Avner, D. Harats, J.
 Roitelman, R. Barbaras, P. Graber, P. Ghersa, M. Smolarsky, A. Funaro, F. Malavasi,
 D. Larrey, J. Coste, J.M. Fabre, A. Sa-Cunha, and P. Maurel. 2007. The low-density
 lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes
 by hepatitis C virus. *J Hepatol.* 46:411-419.
- Mondotte, J.A., P.Y. Lozach, A. Amara, and A.V. Gamarnik. 2007. Essential role of dengue
 virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation.
 J Virol. 81:7136-7148.
- 5096 Mongkolsapaya, J., T. Duangchinda, W. Dejnirattisai, S. Vasanawathana, P. Avirutnan, A.
 5097 Jairungsri, N. Khemnu, N. Tangthawornchaikul, P. Chotiyarnwong, K. Sae-Jang, M.
 5098 Koch, Y. Jones, A. McMichael, X. Xu, P. Malasit, and G. Screaton. 2006. T cell

5099 responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J* 5100 Immunol. 176:3821-3829. 5101 Monod, J., J. Wyman, and J.P. Changeux. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: A 5102 Plausible Model. J Mol Biol. 12:88-118. 5103 Moore, C.G., B.L. Cline, E. Ruiz-Tiben, D. Lee, H. Romney-Joseph, and E. Rivera-Correa. 5104 1978. Aedes aegypti in Puerto Rico: environmental determinants of larval 5105 abundance and relation to dengue virus transmission. Am J Trop Med Hyg. 5106 27:1225-1231. 5107 Morishita, K., C. Kyo, T. Yonemoto, R. Kosugi, T. Ogawa, and T. Inoue. 2017. 5108 Asymptomatic Congenital Hyperinsulinism due to a Glucokinase-Activating Mutation, Treated as Adrenal Insufficiency for Twelve Years. Case Rep Endocrinol. 5109 5110 2017:4709262. 5111 Morrison, J., M. Laurent-Rolle, A.M. Maestre, R. Rajsbaum, G. Pisanelli, V. Simon, L.C. 5112 Mulder, A. Fernandez-Sesma, and A. Garcia-Sastre. 2013. Dengue virus co-opts 5113 UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS Pathog*. 5114 9:e1003265. 5115 Mukherjee, D., S. Das, F. Begum, S. Mal, and U. Ray. 2019. The Mosquito Immune System 5116 and the Life of Dengue Virus: What We Know and Do Not Know. Pathogens. 8. 5117 Mukhopadhyay, S., R.J. Kuhn, and M.G. Rossmann. 2005. A structural perspective of the 5118 flavivirus life cycle. Nat Rev Microbiol. 3:13-22. 5119 Mulukutla, B.C., A. Yongky, T. Le, D.G. Mashek, and W.S. Hu. 2016. Regulation of Glucose 5120 Metabolism - A Perspective From Cell Bioprocessing. Trends Biotechnol. 34:638-5121 651. 5122 Munger, J., S.U. Bajad, H.A. Coller, T. Shenk, and J.D. Rabinowitz. 2006. Dynamics of the 5123 cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog*. 5124 2:e132. 5125 Munger, J., B.D. Bennett, A. Parikh, X.J. Feng, J. McArdle, H.A. Rabitz, T. Shenk, and J.D. 5126 Rabinowitz. 2008. Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid 5127 synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat Biotechnol*. 26:1179-1186. 5128 Munoz-Jordan, J.L., G.G. Sanchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, and A. Garcia-Sastre. 2003. 5129 Inhibition of interferon signaling by dengue virus. Proc Natl Acad Sci USA. 5130 100:14333-14338. 5131 Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato. 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. 5132 5133 Cancer Res. 42:3858-3863. 5134 Nakao, S., C.J. Lai, and N.S. Young. 1989. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood*. 74:1235-1240. 5135 Nasirudeen, A.M., H.H. Wong, P. Thien, S. Xu, K.P. Lam, and D.X. Liu. 2011. RIG-I, MDA5 5136 5137 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus 5138 infection. PLoS Negl Trop Dis. 5:e926. 5139 Navale, A.M., and A.N. Paranjape. 2016. Glucose transporters: physiological and 5140 pathological roles. Biophys Rev. 8:5-9. Navarro-Sanchez, E., R. Altmeyer, A. Amara, O. Schwartz, F. Fieschi, J.L. Virelizier, F. 5141 5142 Arenzana-Seisdedos, and P. Despres. 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-5143 grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic 5144 cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. EMBO Rep. 4:723-728. 5145 Neary, C.L., and J.G. Pastorino. 2013. Akt inhibition promotes hexokinase 2 5146 redistribution and glucose uptake in cancer cells. J Cell Physiol. 228:1943-1948.

- 5147 Netsawang, J., S. Noisakran, C. Puttikhunt, W. Kasinrerk, W. Wongwiwat, P. Malasit, P.T.
 5148 Yenchitsomanus, and T. Limjindaporn. 2010. Nuclear localization of dengue virus
 5149 capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Res.*5150 147:275-283.
- Neveu, G., P. Cassonnet, P.O. Vidalain, C. Rolloy, J. Mendoza, L. Jones, F. Tangy, M. Muller,
 C. Demeret, L. Tafforeau, V. Lotteau, C. Rabourdin-Combe, G. Trave, A. Dricot, D.E.
 Hill, M. Vidal, M. Favre, and Y. Jacob. 2012. Comparative analysis of virus-host
 interactomes with a mammalian high-throughput protein complementation
 assay based on Gaussia princeps luciferase. *Methods*. 58:349-359.
- 5156 Nielsen, S.U., M.F. Bassendine, A.D. Burt, C. Martin, W. Pumeechockchai, and G.L. Toms.
 5157 2006. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein
 5158 (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol*. 80:2418-2428.
- 5159 Niemeyer, H., M. de la Luz Cardenas, E. Rabajille, T. Ureta, L. Clark-Turri, and J.
 5160 Penaranda. 1975. Sigmoidal kinetics of glucokinase. *Enzyme*. 20:321-333.
- 5161 Nishimura, T., T. Iino, M. Mitsuya, M. Bamba, H. Watanabe, D. Tsukahara, K. Kamata, K.
 5162 Sasaki, S. Ohyama, H. Hosaka, M. Futamura, Y. Nagata, and J. Eiki. 2009.
 5163 Identification of novel and potent 2-amino benzamide derivatives as allosteric
 5164 glucokinase activators. *Bioorg Med Chem Lett.* 19:1357-1360.
- 5165 Njolstad, P.R., J.V. Sagen, L. Bjorkhaug, S. Odili, N. Shehadeh, D. Bakry, S.U. Sarici, F. Alpay,
 5166 J. Molnes, A. Molven, O. Sovik, and F.M. Matschinsky. 2003. Permanent neonatal
 5167 diabetes caused by glucokinase deficiency: inborn error of the glucose-insulin
 5168 signaling pathway. *Diabetes*. 52:2854-2860.
- 5169 Onal, G., O. Kutlu, D. Gozuacik, and S. Dokmeci Emre. 2017. Lipid Droplets in Health and
 5170 Disease. *Lipids Health Dis.* 16:128.
- 5171 Osbak, K.K., K. Colclough, C. Saint-Martin, N.L. Beer, C. Bellanne-Chantelot, S. Ellard, and
 5172 A.L. Gloyn. 2009. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause
 5173 maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and
 5174 hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat*. 30:1512-1526.
- 5175 Paes, M.V., H.L. Lenzi, A.C. Nogueira, G.J. Nuovo, A.T. Pinhao, E.M. Mota, C.A. Basilio-de5176 Oliveira, H. Schatzmayr, O.M. Barth, and A.M. Alves. 2009. Hepatic damage
 5177 associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. Lab
 5178 Invest. 89:1140-1151.
- 5179 Panyasrivanit, M., M.P. Greenwood, D. Murphy, C. Isidoro, P. Auewarakul, and D.R. Smith.
 5180 2011. Induced autophagy reduces virus output in dengue infected monocytic
 5181 cells. *Virology*. 418:74-84.
- 5182 Parry, M.J., and D.G. Walker. 1967. Further properties and possibel mechanism of action
 5183 of adenosine 5'-triphosphate-D-glucose 6-phosphotransferase from rat liver.
 5184 *Biochem J*. 105:473-482.
- 5185 Pastorino, J.G., N. Shulga, and J.B. Hoek. 2002. Mitochondrial binding of hexokinase II
 5186 inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*. 277:76105187 7618.
- Patra, K.C., Q. Wang, P.T. Bhaskar, L. Miller, Z. Wang, W. Wheaton, N. Chandel, M. Laakso,
 W.J. Muller, E.L. Allen, A.K. Jha, G.A. Smolen, M.F. Clasquin, B. Robey, and N. Hay.
 2013. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its
 systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell*. 24:213228.
- 5193 Pedersen, P.L., S. Mathupala, A. Rempel, J.F. Geschwind, and Y.H. Ko. 2002. Mitochondrial
 5194 bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many

5195 cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta*. 5196 1555:14-20. 5197 Peiris, J.S., and J.S. Porterfield. 1979. Antibody-mediated enhancement of Flavivirus 5198 replication in macrophage-like cell lines. Nature. 282:509-511. 5199 Peisley, A., and S. Hur. 2013. Multi-level regulation of cellular recognition of viral dsRNA. 5200 Cell Mol Life Sci. 70:1949-1963. 5201 Perera, R., and R.J. Kuhn. 2008. Structural proteomics of dengue virus. Curr Opin 5202 Microbiol. 11:369-377. 5203 Perera-Lecoin, M., L. Meertens, X. Carnec, and A. Amara. 2013. Flavivirus entry 5204 receptors: an update. Viruses. 6:69-88. 5205 Perrin-Cocon, L., A. Aublin-Gex, O. Diaz, C. Ramiere, F. Peri, P. Andre, and V. Lotteau. 2018. Toll-like Receptor 4-Induced Glycolytic Burst in Human Monocyte-Derived 5206 5207 Dendritic Cells Results from p38-Dependent Stabilization of HIF-1alpha and 5208 Increased Hexokinase II Expression. J Immunol. 201:1510-1521. 5209 Perrin-Cocon, L., P. Vidalain, C. Jacquemin, A. Aublin-Gex, K. Olmstead, B. Panthu, G. 5210 Rautureau, P. André, P. Nyczka, M.-T. Hütt, N. Amoedo, R. Rossignol, F. Volker Filipp, V. Lotteau, and O. Diaz. 2020. Lipogenesis and innate immunity in 5211 5212 hepatocellular carcinoma cells reprogrammed by an isoenzyme switch of 5213 hexokinases. bioRxiv. 5214 Pichainarong, N., N. Mongkalangoon, S. Kalayanarooj, and W. Chaveepojnkamjorn. 2006. 5215 Relationship between body size and severity of dengue hemorrhagic fever among 5216 children aged 0-14 years. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 37:283-288. 5217 Pino, M.F., K.A. Kim, K.D. Shelton, J. Lindner, S. Odili, C. Li, H.W. Collins, M. Shiota, F.M. 5218 Matschinsky, and M.A. Magnuson. 2007. Glucokinase thermolability and hepatic 5219 regulatory protein binding are essential factors for predicting the blood glucose 5220 phenotype of missense mutations. J Biol Chem. 282:13906-13916. 5221 Ploegh, H.L. 2007. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the 5222 endoplasmic reticulum. Nature. 448:435-438. 5223 Pokidysheva, E., Y. Zhang, A.J. Battisti, C.M. Bator-Kelly, P.R. Chipman, C. Xiao, G.G. 5224 Gregorio, W.A. Hendrickson, R.J. Kuhn, and M.G. Rossmann. 2006. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition 5225 5226 domain of DC-SIGN. Cell. 124:485-493. 5227 Pong, W.L., Z.S. Huang, P.G. Teoh, C.C. Wang, and H.N. Wu. 2011. RNA binding property and RNA chaperone activity of dengue virus core protein and other viral RNA-5228 interacting proteins. FEBS Lett. 585:2575-2581. 5229 5230 Postic, C., M. Shiota, and M.A. Magnuson. 2001. Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. Recent Prog Horm Res. 56:195-217. 5231 Povoa, T.F., A.M. Alves, C.A. Oliveira, G.J. Nuovo, V.L. Chagas, and M.V. Paes. 2014. The 5232 5233 pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: 5234 histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One*. 9:e83386. 5235 Preller, A., and J.E. Wilson. 1992. Localization of the type III isozyme of hexokinase at the 5236 nuclear periphery. Arch Biochem Biophys. 294:482-492. 5237 Prestwood, T.R., M.M. May, E.M. Plummer, M.M. Morar, L.E. Yauch, and S. Shresta. 2012. 5238 Trafficking and replication patterns reveal splenic macrophages as major targets 5239 of dengue virus in mice. J Virol. 86:12138-12147. 5240 Prusinkiewicz, M.A., and J.S. Mymryk. 2019. Metabolic Reprogramming of the Host Cell 5241 by Human Adenovirus Infection. Viruses. 11. 5242 Pu, J., S. Wu, H. Xie, Y. Li, Z. Yang, X. Wu, and X. Huang. 2017. miR-146a Inhibits dengue-5243 virus-induced autophagy by targeting TRAF6. Arch Virol. 162:3645-3659.

- Pusec, C.M., A. De Jesus, M.W. Khan, A.R. Terry, A.E. Ludvik, K. Xu, N. Giancola, H. Pervaiz,
 E. Daviau Smith, X. Ding, S. Harrison, N.S. Chandel, T.C. Becker, N. Hay, H. Ardehali,
 J. Cordoba-Chacon, and B.T. Layden. 2019. Hepatic HKDC1 Expression
 Contributes to Liver Metabolism. *Endocrinology*. 160:313-330.
- 5248 Quek, L.E., S. Dietmair, J.O. Kromer, and L.K. Nielsen. 2010. Metabolic flux analysis in 5249 mammalian cell culture. *Metab Eng*. 12:161-171.
- 5250Rabin, B.R. 1967. Co-operative effects in enzyme catalysis: a possible kinetic model5251based on substrate-induced conformation isomerization. *Biochem J.* 102:22C-23C.
- 5252Ramiere, C., J. Rodriguez, L.S. Enache, V. Lotteau, P. Andre, and O. Diaz. 2014. Activity of5253hexokinase is increased by its interaction with hepatitis C virus protein NS5A. J5254Virol. 88:3246-3254.
- Ramirez, J.L., and G. Dimopoulos. 2010. The Toll immune signaling pathway control
 conserved anti-dengue defenses across diverse Ae. aegypti strains and against
 multiple dengue virus serotypes. *Dev Comp Immunol*. 34:625-629.
- 5258Raquin, V., and L. Lambrechts. 2017. Dengue virus replicates and accumulates in Aedes5259aegypti salivary glands. *Virology*. 507:75-81.
- Rastogi, M., N. Sharma, and S.K. Singh. 2016. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic
 viral protein. *Virol J.* 13:131.
- Reiss, S., I. Rebhan, P. Backes, I. Romero-Brey, H. Erfle, P. Matula, L. Kaderali, M.
 Poenisch, H. Blankenburg, M.S. Hiet, T. Longerich, S. Diehl, F. Ramirez, T. Balla, K.
 Rohr, A. Kaul, S. Buhler, R. Pepperkok, T. Lengauer, M. Albrecht, R. Eils, P.
 Schirmacher, V. Lohmann, and R. Bartenschlager. 2011. Recruitment and
 activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of
 the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe*. 9:32-45.
- 5268 Reyes-Del Valle, J. 2014. Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. *Curr Trop Med* 5269 *Rep*.
- Reyes-Del Valle, J., S. Chavez-Salinas, F. Medina, and R.M. Del Angel. 2005. Heat shock
 protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor
 complex in human cells. *J Virol*. 79:4557-4567.
- 5273 Ricard, J., J.C. Meunier, and J. Buc. 1974. Regulatory behavior of monomeric enzymes. 1.
 5274 The mnemonical enzyme concept. *Eur J Biochem*. 49:195-208.
- 5275 Ricchi, M., M.R. Odoardi, L. Carulli, C. Anzivino, S. Ballestri, A. Pinetti, L.I. Fantoni, F.
 5276 Marra, M. Bertolotti, S. Banni, A. Lonardo, N. Carulli, and P. Loria. 2009.
 5277 Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis
 5278 in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol*. 24:830-840.
- 5279Rico-Hesse, R. 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. Adv Virus Res.528059:315-341.
- Ritter, J.B., A.S. Wahl, S. Freund, Y. Genzel, and U. Reichl. 2010. Metabolic effects of
 influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular
 metabolite profiling. *BMC Syst Biol.* 4:61.
- Roberts, D.J., and S. Miyamoto. 2015. Hexokinase II integrates energy metabolism and
 cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ*. 22:248-257.
- Roberts, D.J., V.P. Tan-Sah, E.Y. Ding, J.M. Smith, and S. Miyamoto. 2014. Hexokinase-II
 positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1
 inhibition. *Mol Cell*. 53:521-533.
- Rocha, B.A.M., A.O. Guilarde, A. Argolo, M.P. Tassara, L.A. da Silveira, I.C. Junqueira, M.D.
 Turchi, V.C.R. Feres, and C.M.T. Martelli. 2017. Dengue-specific serotype related

5292 to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil. *Infect Dis* 5293 *Poverty*. 6:116. 5294 Rodhain, F. 1993. [Aedes albopictus in Europe: a real threat]. *Bull Soc Pathol Exot.* 86:3. 5295 Rodhain, F. 1995. Aedes albopictus: a potential problem in France. Parassitologia. 5296 37:115-119. 5297 Rodriguez-Sanchez, I., and J. Munger. 2019. Meal for Two: Human Cytomegalovirus-5298 Induced Activation of Cellular Metabolism. Viruses. 11. 5299 Romero-Brey, I., and R. Bartenschlager. 2016. Endoplasmic Reticulum: The Favorite 5300 Intracellular Niche for Viral Replication and Assembly. Viruses. 8. 5301 Roosendaal, J., E.G. Westaway, A. Khromykh, and J.M. Mackenzie. 2006. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in 5302 5303 rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. J 5304 Virol. 80:4623-4632. 5305 Rosen, L., D.A. Shroyer, R.B. Tesh, J.E. Freier, and J.C. Lien. 1983. Transovarial 5306 transmission of dengue viruses by mosquitoes: Aedes albopictus and Aedes 5307 aegypti. Am J Trop Med Hyg. 32:1108-1119. Rosso, F., J.C. Pineda, A.M. Sanz, J.A. Cedano, and L.A. Caicedo. 2018. Transmission of 5308 5309 dengue virus from deceased donors to solid organ transplant recipients: case 5310 report and literature review. Braz J Infect Dis. 22:63-69. 5311 Rothwell, C., A. Lebreton, C. Young Ng, J.Y. Lim, W. Liu, S. Vasudevan, M. Labow, F. Gu, 5312 and L.A. Gaither. 2009. Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue 5313 viral replication. Virology. 389:8-19. 5314 Sagen, J.V., S. Odili, L. Bjorkhaug, D. Zelent, C. Buettger, J. Kwagh, C. Stanley, K. Dahl-5315 Jorgensen, C. de Beaufort, G.I. Bell, Y. Han, J. Grimsby, R. Taub, A. Molven, O. Sovik, 5316 P.R. Njolstad, and F.M. Matschinsky. 2006. From clinicogenetic studies of 5317 maturity-onset diabetes of the young to unraveling complex mechanisms of 5318 glucokinase regulation. Diabetes. 55:1713-1722. 5319 Sakinah, S., S.P. Priya, S. Kumari, F. Amira, P. K, H. Alsaeedy, M.P. Ling, H.Y. Chee, A. 5320 Higuchi, A.A. Alarfaj, M.A. Munusamy, K. Murugan, C.N. Taib, P. Arulselvan, M. 5321 Rajan, V.K. Neela, R.A. Hamat, G. Benelli, and S.S. Kumar. 2017. Impact of dengue virus (serotype DENV-2) infection on liver of BALB/c mice: A histopathological 5322 5323 analysis. Tissue Cell. 49:86-94. 5324 Salazar, M.I., J.H. Richardson, I. Sanchez-Vargas, K.E. Olson, and B.J. Beaty. 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti 5325 5326 mosquitoes. BMC Microbiol. 7:9. 5327 Samanta, J., and V. Sharma. 2015. Dengue and its effects on liver. World J Clin Cases. 5328 3:125-131. 5329 Samsa, M.M., J.A. Mondotte, N.G. Iglesias, I. Assuncao-Miranda, G. Barbosa-Lima, A.T. Da 5330 Poian, P.T. Bozza, and A.V. Gamarnik. 2009. Dengue virus capsid protein usurps 5331 lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog*. 5:e1000632. 5332 Sanchez, E.L., and M. Lagunoff. 2015. Viral activation of cellular metabolism. *Virology*. 5333 479-480:609-618. 5334 Sanchez, I.J., and B.H. Ruiz. 1996. A single nucleotide change in the E protein gene of 5335 dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. J Gen Virol. 77 (Pt 5336 10):2541-2545. 5337 Sanchez, V., and J.J. Dong. 2010. Alteration of lipid metabolism in cells infected with 5338 human cytomegalovirus. Virology. 404:71-77. 5339 Sanchez-Vargas, I., L.C. Harrington, J.B. Doty, W.C.t. Black, and K.E. Olson. 2018. 5340 Demonstration of efficient vertical and venereal transmission of dengue virus

5341 type-2 in a genetically diverse laboratory strain of Aedes aegypti. *PLoS Negl Trop* 5342 Dis. 12:e0006754. 5343 Scaturro, P., M. Cortese, L. Chatel-Chaix, W. Fischl, and R. Bartenschlager. 2015. Dengue 5344 Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via 5345 Interaction with the Structural Proteins. PLoS Pathog. 11:e1005277. 5346 Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice. 2014. Interferon-stimulated genes: a 5347 complex web of host defenses. Annu Rev Immunol. 32:513-545. Sen, S., R. Kaminiski, S. Deshmane, D. Langford, K. Khalili, S. Amini, and P.K. Datta. 2015. 5348 Role of hexokinase-1 in the survival of HIV-1-infected macrophages. *Cell Cycle*. 5349 5350 14:980-989. Shafee, N., and S. AbuBakar. 2003. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 5351 protease precursor induce apoptosis. J Gen Virol. 84:2191-2195. 5352 5353 Shapiro, J., N. Sciaky, J. Lee, H. Bosshart, R.H. Angeletti, and J.S. Bonifacino. 1997. 5354 Localization of endogenous furin in cultured cell lines. J Histochem Cytochem. 5355 45:3-12. 5356 Shimizu, Y., T. Hishiki, K. Sugiyama, K. Ogawa, K. Funami, A. Kato, Y. Ohsaki, T. Fujimoto, H. Takaku, and K. Shimotohno. 2010. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride 5357 5358 lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic 5359 activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology*. 407:152-159. 5360 Silva, A.C., P.T. A, and M.A. P. 2016. Impact of Adenovirus infection in host cell 5361 metabolism evaluated by (1)H-NMR spectroscopy. J Biotechnol. 231:16-23. 5362 Silva, E.M., J.N. Conde, D. Allonso, G.T. Ventura, D.R. Coelho, P.H. Carneiro, M.L. Silva, M.V. 5363 Paes, K. Rabelo, G. Weissmuller, P.M. Bisch, and R. Mohana-Borges. 2019. Dengue 5364 virus nonstructural 3 protein interacts directly with human glyceraldehyde-3-5365 phosphate dehydrogenase (GAPDH) and reduces its glycolytic activity. Sci Rep. 5366 9:2651. 5367 Singleton, M.R., and D.B. Wigley. 2002. Modularity and specialization in superfamily 1 5368 and 2 helicases. J Bacteriol. 184:1819-1826. 5369 Somnuke, P., R.E. Hauhart, J.P. Atkinson, M.S. Diamond, and P. Avirutnan. 2011. N-linked 5370 glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement. 5371 5372 Virology. 413:253-264. 5373 Storer, A.C., and A. Cornish-Bowden. 1977. Kinetic evidence for a 'mnemonical' 5374 mechanism for rat liver glucokinase. *Biochem J.* 165:61-69. 5375 Straub, B.K., E. Herpel, S. Singer, R. Zimbelmann, K. Breuhahn, S. Macher-Goeppinger, A. Warth, J. Lehmann-Koch, T. Longerich, H. Heid, and P. Schirmacher. 2010. Lipid 5376 droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in 5377 5378 neoplastic steatogenesis. Mod Pathol. 23:480-492. 5379 Straub, B.K., P. Stoeffel, H. Heid, R. Zimbelmann, and P. Schirmacher. 2008. Differential 5380 pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in 5381 hepatocyte steatogenesis. *Hepatology*. 47:1936-1946. 5382 Sui, D., and J.E. Wilson. 1997. Structural determinants for the intracellular localization of 5383 the isozymes of mammalian hexokinase: intracellular localization of fusion 5384 constructs incorporating structural elements from the hexokinase isozymes and 5385 the green fluorescent protein. Arch Biochem Biophys. 345:111-125. 5386 Suksanpaisan, L., T. Susantad, and D.R. Smith. 2009. Characterization of dengue virus 5387 entry into HepG2 cells. J Biomed Sci. 16:17. 5388 Sun, P., S. Fernandez, M.A. Marovich, D.R. Palmer, C.M. Celluzzi, K. Boonnak, Z. Liang, H. 5389 Subramanian, K.R. Porter, W. Sun, and T.H. Burgess. 2009. Functional

- 5390 characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after 5391 infection with dengue virus. *Virology*. 383:207-215.
- Suwarto, S., R.A. Diahtantri, M.J. Hidayat, and B. Widjaya. 2018. Nonalcoholic fatty liver
 disease is associated with increased hemoconcentration, thrombocytopenia, and
 longer hospital stay in dengue-infected patients with plasma leakage. *PLoS One*.
 13:e0205965.
- Swarbrick, C.M.D., C. Basavannacharya, K.W.K. Chan, S.A. Chan, D. Singh, N. Wei, W.W.
 Phoo, D. Luo, J. Lescar, and S.G. Vasudevan. 2017. NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. *Nucleic Acids Res.* 45:12904-12920.
- 5400 Tafforeau, L., C. Rabourdin-Combe, and V. Lotteau. 2012. Virus-human cell interactomes.
 5401 *Methods Mol Biol.* 812:103-120.
- Takahashi, K., N. Hashimoto, C. Nakama, K. Kamata, K. Sasaki, R. Yoshimoto, S. Ohyama,
 H. Hosaka, H. Maruki, Y. Nagata, J. Eiki, and T. Nishimura. 2009. The design and
 optimization of a series of 2-(pyridin-2-yl)-1H-benzimidazole compounds as
 allosteric glucokinase activators. *Bioorg Med Chem*. 17:7042-7051.
- 5406Taube, S., M. Jiang, and C.E. Wobus. 2010. Glycosphingolipids as receptors for non-
enveloped viruses. *Viruses*. 2:1011-1049.
- Tay, M.Y., W.G. Saw, Y. Zhao, K.W. Chan, D. Singh, Y. Chong, J.K. Forwood, E.E. Ooi, G.
 Gruber, J. Lescar, D. Luo, and S.G. Vasudevan. 2015. The C-terminal 50 amino acid
 residues of dengue NS3 protein are important for NS3-NS5 interaction and viral
 replication. *J Biol Chem.* 290:2379-2394.
- Teoh, B.T., S.S. Sam, J. Abd-Jamil, and S. AbuBakar. 2010. Isolation of ancestral sylvatic
 dengue virus type 1, Malaysia. *Emerg Infect Dis.* 16:1783-1785.
- Thaker, S.K., J. Ch'ng, and H.R. Christofk. 2019. Viral hijacking of cellular metabolism.
 BMC Biol. 17:59.
- 5416 Thammapalo, S., V. Chongsuvivatwong, A. Geater, and M. Dueravee. 2008. Environmental
 5417 factors and incidence of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in an
 5418 urban area, Southern Thailand. *Epidemiol Infect*. 136:135-143.
- 5419 Thepparit, C., and D.R. Smith. 2004. Serotype-specific entry of dengue virus into liver
 5420 cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin
 5421 receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol*. 78:12647-12656.
- 5422Thiam, A.R., and M. Beller. 2017. The why, when and how of lipid droplet diversity. J Cell5423Sci. 130:315-324.
- 5424 Thiemmeca, S., C. Tamdet, N. Punyadee, T. Prommool, A. Songjaeng, S. Noisakran, C.
 5425 Puttikhunt, J.P. Atkinson, M.S. Diamond, A. Ponlawat, and P. Avirutnan. 2016.
 5426 Secreted NS1 Protects Dengue Virus from Mannose-Binding Lectin-Mediated
 5427 Neutralization. *J Immunol*. 197:4053-4065.
- Thomas, L., F. Najioullah, F. Besnier, R. Valentino, R. Cesaire, J. Rosine, A. Cabie, and D.
 Working Group on. 2014. Clinical presentation of dengue by serotype and year of
 epidemic in Martinique. *Am J Trop Med Hyg.* 91:138-145.
- Thongyuan, S., and P. Kittayapong. 2017. First evidence of dengue infection in domestic
 dogs living in different ecological settings in Thailand. *PLoS One*. 12:e0180013.
- 5433 Torres, S., J.C. Hernandez, D. Giraldo, M. Arboleda, M. Rojas, J.M. Smit, and S. Urcuqui5434 Inchima. 2013. Differential expression of Toll-like receptors in dendritic cells of
 5435 patients with dengue during early and late acute phases of the disease. *PLoS Negl*5436 *Trop Dis.* 7:e2060.

- 5437 Tsai, B., J.M. Gilbert, T. Stehle, W. Lencer, T.L. Benjamin, and T.A. Rapoport. 2003.
 5438 Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22:43465439 4355.
- 5440 Tsai, H.J. 1999. Functional organization and evolution of mammalian hexokinases:
 5441 mutations that caused the loss of catalytic activity in N-terminal halves of type I
 5442 and type III isozymes. *Arch Biochem Biophys.* 369:149-156.
- 5443 Tsai, H.J., and J.E. Wilson. 1996. Functional organization of mammalian hexokinases:
 5444 both N- and C-terminal halves of the rat type II isozyme possess catalytic sites.
 5445 Arch Biochem Biophys. 329:17-23.
- 5446Tsai, Y.T., S.Y. Chang, C.N. Lee, and C.L. Kao. 2009. Human TLR3 recognizes dengue virus5447and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol*. 11:604-615.
- 5448 Uno, N., and T.M. Ross. 2018. Dengue virus and the host innate immune response. *Emerg* 5449 *Microbes Infect.* 7:167.
- 5450 Upanan, S., A. Kuadkitkan, and D.R. Smith. 2008. Identification of dengue virus binding 5451 proteins using affinity chromatography. *J Virol Methods*. 151:325-328.
- 5452 Ureta, T. 1982. The comparative isozymology of vertebrate hexokinases. *Comp Biochem* 5453 *Physiol B*. 71:549-555.
- van der Schaar, H.M., M.J. Rust, C. Chen, H. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut, X.
 Zhuang, and J.M. Smit. 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog*. 4:e1000244.
- 5457 Van Schaftingen, E. 1989. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of
 5458 being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 15459 phosphate. *Eur J Biochem*. 179:179-184.
- 5460 Varanasi, S.K., U. Jaggi, N. Hay, and B.T. Rouse. 2018. Hexokinase II may be dispensable
 5461 for CD4 T cell responses against a virus infection. *PLoS One*. 13:e0191533.
- Varga, N., I. Sutkeviciute, R. Ribeiro-Viana, A. Berzi, R. Ramdasi, A. Daghetti, G. Vettoretti,
 A. Amara, M. Clerici, J. Rojo, F. Fieschi, and A. Bernardi. 2014. A multivalent
 inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and Dengue virus. *Biomaterials*. 35:4175-4184.
- Vasilakis, N., J. Cardosa, M. Diallo, A.A. Sall, E.C. Holmes, K.A. Hanley, S.C. Weaver, J. Mota,
 and R. Rico-Hesse. 2010. Sylvatic dengue viruses share the pathogenic potential
 of urban/endemic dengue viruses. *J Virol*. 84:3726-3727; author reply 37273728.
- 5470 Vasilakis, N., J. Cardosa, K.A. Hanley, E.C. Holmes, and S.C. Weaver. 2011. Fever from the
 5471 forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its
 5472 impact on public health. *Nat Rev Microbiol*. 9:532-541.
- 5473 Vastag, L., E. Koyuncu, S.L. Grady, T.E. Shenk, and J.D. Rabinowitz. 2011. Divergent effects
 5474 of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism.
 5475 *PLoS Pathog.* 7:e1002124.
- 5476 Vazquez-Pichardo, M., Rosales-Jimenez, C, Rojas-Espinosa, O & Lopez-Martinez, I. 2006.
 5477 Is Liver Damage Dependent on the Serotype of Dengue Virus?-A Study in Maxico.
 5478 WHO Regional Office for South-East Asia.
- 5479 Vicente, C.R., K.H. Herbinger, G. Froschl, C. Malta Romano, A. de Souza Areias Cabidelle,
 5480 and C. Cerutti Junior. 2016. Serotype influences on dengue severity: a cross5481 sectional study on 485 confirmed dengue cases in Vitoria, Brazil. *BMC Infect Dis*.
 5482 16:320.
- 5483 Vinuela, E., M. Salas, and A. Sols. 1963. Glucokinase and hexokinase in liver in relation to
 5484 glycogen synthesis. *J Biol Chem.* 238:1175-1177.

- 5485 Vionnet, N., M. Stoffel, J. Takeda, K. Yasuda, G.I. Bell, H. Zouali, S. Lesage, G. Velho, F. Iris,
 5486 P. Passa, and et al. 1992. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early5487 onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 356:721-722.
- 5488 Walther, T.C., and R.V. Farese, Jr. 2009. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*.
 5489 1791:459-466.
- 5490 Wang, J.P., P. Liu, E. Latz, D.T. Golenbock, R.W. Finberg, and D.H. Libraty. 2006. Flavivirus
 5491 activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7
 5492 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol*. 177:7114-7121.
- 5493 Warburg, O. 1925. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klin Wochenschr*. 4:534–
 5494 536.
- 5495 Watanabe, Y., T.A. Bowden, I.A. Wilson, and M. Crispin. 2019. Exploitation of
 5496 glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.*5497 1863:1480-1497.
- 5498 Watterson, D., B. Kobe, and P.R. Young. 2012. Residues in domain III of the dengue virus
 5499 envelope glycoprotein involved in cell-surface glycosaminoglycan binding. *J Gen*5500 *Virol.* 93:72-82.
- Watterson, D., N. Modhiran, and P.R. Young. 2016. The many faces of the flavivirus NS1
 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res.* 130:7-18.
- Weaver, S.C., and N. Vasilakis. 2009. Molecular evolution of dengue viruses:
 contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of
 the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 9:523-540.
- Welsch, S., S. Miller, I. Romero-Brey, A. Merz, C.K. Bleck, P. Walther, S.D. Fuller, C. Antony,
 J. Krijnse-Locker, and R. Bartenschlager. 2009. Composition and threedimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. 5:365-375.
- White, T.K., and J.E. Wilson. 1989. Isolation and characterization of the discrete N- and C terminal halves of rat brain hexokinase: retention of full catalytic activity in the
 isolated C-terminal half. Arch Biochem Biophys. 274:375-393.
- Whittington, A.C., M. Larion, J.M. Bowler, K.M. Ramsey, R. Bruschweiler, and B.G. Miller.
 2015. Dual allosteric activation mechanisms in monomeric human glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:11553-11558.
- 5516 Wilson, J.E. 1995. Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 126:65-198.
- Wilson, J.E. 1997. An introduction to the isoenzymes of mammalian hexokinase types I III. *Biochem Soc Trans.* 25:103-107.
- Wilson, J.E. 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization
 and metabolic function. *J Exp Biol*. 206:2049-2057.
- Wilson, M.E., and D.O. Freedman. 2007. Etiology of travel-related fever. *Curr Opin Infect Dis.* 20:449-453.
- Wirawan, M., G. Fibriansah, J.K. Marzinek, X.X. Lim, T.S. Ng, A.Y.L. Sim, Q. Zhang, V.A.
 Kostyuchenko, J. Shi, S.A. Smith, C.S. Verma, G. Anand, J.E. Crowe, Jr., P.J. Bond, and
 S.M. Lok. 2019. Mechanism of Enhanced Immature Dengue Virus Attachment to
 Endosomal Membrane Induced by prM Antibody. *Structure*. 27:253-267 e258.
- Wolf, A., S. Agnihotri, J. Micallef, J. Mukherjee, N. Sabha, R. Cairns, C. Hawkins, and A.
 Guha. 2011. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J Exp Med*. 208:313-326.
- Wolf, A.J., C.N. Reyes, W. Liang, C. Becker, K. Shimada, M.L. Wheeler, H.C. Cho, N.I.
 Popescu, K.M. Coggeshall, M. Arditi, and D.M. Underhill. 2016. Hexokinase Is an
 Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell*.
 166:624-636.

5534 Wu, S.J., G. Grouard-Vogel, W. Sun, J.R. Mascola, E. Brachtel, R. Putvatana, M.K. Louder, L. 5535 Filgueira, M.A. Marovich, H.K. Wong, A. Blauvelt, G.S. Murphy, M.L. Robb, B.L. 5536 Innes, D.L. Birx, C.G. Hayes, and S.S. Frankel. 2000. Human skin Langerhans cells 5537 are targets of dengue virus infection. Nat Med. 6:816-820. Wu, Y.W., C. Mettling, S.R. Wu, C.Y. Yu, G.C. Perng, Y.S. Lin, and Y.L. Lin. 2016. Autophagy-5538 5539 associated dengue vesicles promote viral transmission avoiding antibody 5540 neutralization. Sci Rep. 6:32243. Xiao, X., Y. Liu, X. Zhang, J. Wang, Z. Li, X. Pang, P. Wang, and G. Cheng. 2014. 5541 Complement-related proteins control the flavivirus infection of Aedes aegypti by 5542 5543 inducing antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* 10:e1004027. 5544 Xie, X., J. Zou, C. Puttikhunt, Z. Yuan, and P.Y. Shi. 2015. Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. J 5545 5546 Virol. 89:1298-1313. 5547 Xie, X., J. Zou, X. Zhang, Y. Zhou, A.L. Routh, C. Kang, V.L. Popov, X. Chen, Q.Y. Wang, H. 5548 Dong, and P.Y. Shi. 2019. Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. Cell 5549 Host Microbe. 26:606-622 e608. 5550 Xu, L.Z., I.T. Weber, R.W. Harrison, M. Gidh-Jain, and S.J. Pilkis. 1995. Sugar specificity of 5551 human beta-cell glucokinase: correlation of molecular models with kinetic 5552 measurements. Biochemistry. 34:6083-6092. 5553 Xu, L.Z., W. Zhang, I.T. Weber, R.W. Harrison, and S.J. Pilkis. 1994. Site-directed 5554 mutagenesis studies on the determinants of sugar specificity and cooperative 5555 behavior of human beta-cell glucokinase. J Biol Chem. 269:27458-27465. 5556 Xu, T., A. Sampath, A. Chao, D. Wen, M. Nanao, P. Chene, S.G. Vasudevan, and J. Lescar. 5557 2005. Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic 5558 domain at a resolution of 2.4 A. J Virol. 79:10278-10288. 5559 Yamamoto, M., H. Aizaki, M. Fukasawa, T. Teraoka, T. Miyamura, T. Wakita, and T. 5560 Suzuki. 2011. Structural requirements of virion-associated cholesterol for 5561 infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. J 5562 Gen Virol. 92:2082-2087. 5563 Yamamoto, S., T. Fukuhara, C. Ono, K. Uemura, Y. Kawachi, M. Shiokawa, H. Mori, M. Wada, R. Shima, T. Okamoto, N. Hiraga, R. Suzuki, K. Chayama, T. Wakita, and Y. 5564 Matsuura. 2016. Lipoprotein Receptors Redundantly Participate in Entry of 5565 5566 Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog*. 12:e1005610. Yi, L., J. Fang, N. Isik, J. Chim, and T. Jin. 2006. HIV gp120-induced interaction between 5567 CD4 and CCR5 requires cholesterol-rich microenvironments revealed by live cell 5568 fluorescence resonance energy transfer imaging. J Biol Chem. 281:35446-35453. 5569 Yon, C., T. Teramoto, N. Mueller, J. Phelan, V.K. Ganesh, K.H. Murthy, and R. 5570 Padmanabhan. 2005. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase 5571 and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural 5572 5573 protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. J 5574 Biol Chem. 280:27412-27419. 5575 Yoshimura, A., H.M. Ohishi, D. Aki, and T. Hanada. 2004. Regulation of TLR signaling and 5576 inflammation by SOCS family proteins. J Leukoc Biol. 75:422-427. 5577 Yu, C.Y., T.H. Chang, J.J. Liang, R.L. Chiang, Y.L. Lee, C.L. Liao, and Y.L. Lin. 2012. Dengue 5578 virus targets the adaptor protein MITA to subvert host innate immunity. *PLoS* 5579 Pathog. 8:e1002780. 5580 Yu, I.M., H.A. Holdaway, P.R. Chipman, R.J. Kuhn, M.G. Rossmann, and J. Chen. 2009. 5581 Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane 5582 fusion. / Virol. 83:12101-12107.

- Yu, I.M., W. Zhang, H.A. Holdaway, L. Li, V.A. Kostyuchenko, P.R. Chipman, R.J. Kuhn, M.G.
 Rossmann, and J. Chen. 2008. Structure of the immature dengue virus at low pH
 primes proteolytic maturation. *Science*. 319:1834-1837.
- 5586 Yu, Y., A.J. Clippinger, and J.C. Alwine. 2011a. Viral effects on metabolism: changes in
 5587 glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection.
 5588 *Trends Microbiol.* 19:360-367.
- 5589 Yu, Y., T.G. Maguire, and J.C. Alwine. 2011b. Human cytomegalovirus activates glucose
 5590 transporter 4 expression to increase glucose uptake during infection. *J Virol.*5591 85:1573-1580.
- Yung, C.F., K.S. Lee, T.L. Thein, L.K. Tan, V.C. Gan, J.G.X. Wong, D.C. Lye, L.C. Ng, and Y.S.
 Leo. 2015. Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation,
 laboratory parameters and risk of severe disease in adults, singapore. *Am J Trop Med Hyg.* 92:999-1005.
- Yusof, R., S. Clum, M. Wetzel, H.M. Murthy, and R. Padmanabhan. 2000. Purified
 NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B
 dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. *J Biol Chem.* 275:9963-9969.
- Zaitseva, E., S.T. Yang, K. Melikov, S. Pourmal, and L.V. Chernomordik. 2010. Dengue
 virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids.
 PLoS Pathog. 6:e1001131.
- Zeidler, J.D., L.O. Fernandes-Siqueira, G.M. Barbosa, and A.T. Da Poian. 2017. Non Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. *Viruses*. 9.
- Zelent, B., S. Odili, C. Buettger, C. Shiota, J. Grimsby, R. Taub, M.A. Magnuson, J.M.
 Vanderkooi, and F.M. Matschinsky. 2008. Sugar binding to recombinant wild-type
 and mutant glucokinase monitored by kinetic measurement and tryptophan
 fluorescence. *Biochem J.* 413:269-280.
- Zhang, Q., C. Hunke, Y.H. Yau, V. Seow, S. Lee, L.B. Tanner, X.L. Guan, M.R. Wenk, G.
 Fibriansah, P.L. Chew, P. Kukkaro, G. Biukovic, P.Y. Shi, S.G. Shochat, G. Gruber,
 and S.M. Lok. 2012. The stem region of premembrane protein plays an important
 role in the virus surface protein rearrangement during dengue maturation. *J Biol Chem.* 287:40525-40534.
- Zhang, W., P.R. Chipman, J. Corver, P.R. Johnson, Y. Zhang, S. Mukhopadhyay, T.S. Baker,
 J.H. Strauss, M.G. Rossmann, and R.J. Kuhn. 2003a. Visualization of membrane
 protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol.*10:907-912.
- 5618 Zhang, Y., J. Corver, P.R. Chipman, W. Zhang, S.V. Pletnev, D. Sedlak, T.S. Baker, J.H.
 5619 Strauss, R.J. Kuhn, and M.G. Rossmann. 2003b. Structures of immature flavivirus 5620 particles. *EMBO J.* 22:2604-2613.
- Zhang, Y., V.A. Kostyuchenko, and M.G. Rossmann. 2007. Structural analysis of viral
 nucleocapsids by subtraction of partial projections. *J Struct Biol*. 157:356-364.
- Zou, W., and M. Al-Rubeai. 2016. Understanding central carbon metabolism of rapidly
 proliferating mammalian cells based on analysis of key enzymatic activities in GS CHO cell lines. *Biotechnol Appl Biochem*. 63:642-651.
- 5626 Zybert, I.A., H. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut, and J.M. Smit. 2008. Functional
 5627 importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature
 5628 virions. J Gen Virol. 89:3047-3051.

Annexes

Liste des publications et posters

- Replication of the dengue virus in HuH7 cells depends on glucokinase expression and is inhibited by its negative regulatory protein GKRP. Marianne FIGL, Clémence JACQUEMIN, Cindy KUNDLACZ, Pierre-Olivier VIDALAIN, Anne AUBLIN-GEX, Laure PERRIN-COCON, Patrice ANDRE, Vincent LOTTEAU, Olivier DIAZ (publication en préparation)
- International Liver Congress (EASL) 2019. Vienne, Autriche. Dengue virus protein NS3 activates hexokinase activity in hepatocytes to support virus replication. Marianne Figl, Clémence Jacquemin, Patrice André, Laure Perrin-Cocon, Vincent Lotteau, Olivier Diaz. Volume 70, Issue 1, Supplement, April 2019, Page e805 (publication)
- Journées francophones de virologie 2019, La protéine NS3 du virus de la dengue stimule l'activité hexokinase dans les hépatocytes pour supporter la réplication virale. Marianne Figl, Clémence Jacquemin, Patrice André, Laure Perrin-Cocon, Vincent Lotteau, Olivier Diaz. (Poster)

Abstract

5629	Dengue virus (DENV) is an arbovirus which is transmitted by Aedes mosquitoes (Aedes
5630	aegypti and Aedes albopictus commonly known as tiger mosquitoes). This viral infection is
5631	today a major public health problem due to the spread of the vector and for which no
5632	therapeutic nor vaccine solution is available. In severe forms, which occur in 1 to 5% of cases
5633	(haemorrhagic fevers and life-threatening prognosis), liver damages are observed but their
5634	origins are still poorly understood and probably multifactorial. In addition, hepatic steatosis
5635	and obesity have been shown to be aggravating factors of the pathology.
5636	
5637	A growing literature shows that viruses are capable of modulating carbohydrate and lipid
5638	metabolisms to promote their replication. In case of DENV infection, it has also been
5639	observed that the virus is capable of modulating these cellular metabolic pathways to promote
5640	its replication, but the underlying molecular mechanisms are poorly characterized. We have
5641	observed that overexpression of DENV NS3 protein increases glycolysis in the
5642	hepatocarcinoma cells HuH7. We have also identified interaction of NS3 with the different
5643	cellular hexokinases (HK) that control the first step of glycolysis. The expression of HK4,
5644	normally and specifically expressed in hepatocytes, restores lipogenesis in HuH7 cells and
5645	promotes viral replication. We also identified NS3 as interacting with GKRP, the negative
5646	regulator of HK4. Overexpression of GKRP or modulation of its activity on HK4 by
5647	metabolic factors such as fructose-6-phosphate, inhibits viral replication. Overall, these
5648	observations suggest an interference between NS3 protein and the control of the first step of
5649	glycolysis.

5650 Keywords : Dengue virus ; hexokinase ; GKRP; glycolysis ; lipid metabolism

Résumé

5651	Le virus de la Dengue (DENV) est un arbovirus transmis par les moustiques du genre Aedes
5652	(Ae. aegypti et Ae. albopictus, communément appelé moustique tigre). Le DENV constitue
5653	un problème de santé publique majeur du fait de l'expansion du vecteur et pour lequel aucune
5654	solution thérapeutique ou vaccinale n'est disponible. Dans les formes sévères de la pathologie
5655	(fièvres hémorragiques), on observe une atteinte hépatique dont les causes sont
5656	multifactorielles et encore mal connues. Par ailleurs, stéatose hépatique et obésité constituent
5657	des facteurs aggravant la pathologie.
5658	
5659	Une littérature de plus en plus abondante montre que les virus sont capables de moduler le
5660	métabolisme glucidique et lipidique pour favoriser leur réplication. Il a également été observé
5661	que le DENV est capable de moduler le métabolique cellulaire pour favoriser sa réplication
5662	mais les mécanismes moléculaires sous-jacents sont peu caractérisés. Nous avons observé que
5663	l'expression de la protéine NS3 du DENV est capable d'induire une augmentation de la
5664	glycolyse dans des cellules d'hépatocarcinome HuH7. Nous avons également identifié
5665	l'interaction de NS3 avec les différentes hexokinases (HK), premières enzymes de la
5666	glycolyse. L'expression d'HK4, spécifique aux hépatocytes, dans des HuH7 restaure la
5667	lipogenèse et favorise la réplication virale. Nous avons également identifié l'interaction de
5668	NS3 avec GKRP, régulateur négatif d'HK4. La surexpression de GKRP ou la modulation de
5669	son activité sur HK4 par des facteurs métaboliques inhibe la réplication virale. L'ensemble
5670	des observations suggère une interférence entre la protéine NS3 et la régulation de l'activité
5671	HK4 par GKRP, favorisant ainsi l'infection.

5672 Mots clés : Virus de la dengue ; hexokinase ; GKRP ; glycolyse ; métabolisme lipidique